

Université de Montréal

Caractérisation du carcinome mammaire de phénotype basal

par

Dr Isabel García de la Fuente

Département de Pathologie et Biologie Cellulaire

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de M.Sc

en Pathologie et Biologie Cellulaire

option Cancérologie

Septembre, 2006

©, Isabel Garcia de la Fuente, 2006

W

H

U58

2007

V.089

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Caractérisation des carcinomes mammaires de phénotype basal

Présenté par:

Dr Isabel Garcia de la Fuente

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

BENDAYAN MOISE
président-rapporteur

GABOURY LOUIS
directeur de recherche

BALICKI DANUTA
codirectrice

BASIK MARK
membre du jury



RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS

Les carcinomes mammaires qui possèdent des caractéristiques des cellules basales/myoépithéliales du sein sont à ce jour très mal connus, et encore ignorés en pratique clinique. Selon les études par profil génétique, les carcinomes mammaires de phénotype basal sont fréquents, agressifs, et réfractaires au traitement. Dans les faits, le carcinome de phénotype basal demeure une entité nébuleuse pour le clinicien. L'objectif de notre travail a été de mieux caractériser par histologie, par immunohistochimie et par FISH ce type tumoral. Plus de 100 patientes suivies pour carcinome mammaire ont été sélectionnées rétrospectivement à partir des archives du département de pathologie du CHUM. Nous avons construit des micromatrices tissulaires à partir des blocs tumoraux disponibles, pour identifier et caractériser les carcinomes mammaires de phénotype basal. Le marquage pour certains marqueurs des cellules basales/myoépithéliales (CK5, CK14, CK17, aSMA et HER1) a permis d'identifier plusieurs de ces tumeurs. Plus de 50% des carcinomes canalaire de haut grade, qui n'expriment pas les récepteurs hormonaux et ne présentent pas d'amplification du gène HER2 en FISH, expriment ces marqueurs de différenciation. La plupart de ces cancers ne montrent pas non plus d'amplification du gène de la topoisomérase. Les principales caractéristiques morphologiques de ces tumeurs sont les suivantes: plages de nécrose étendue, inflammation et réaction desmoplastique bien développée.

Pris dans leur ensemble, nos résultats soulignent l'importance de poursuivre la caractérisation de ces cancers car ils pourraient bénéficier d'une prise en charge particulière susceptible d'améliorer la survie de ces patientes.

Mots clés: cancer, sein, micromatrices tissulaires, histologie, immunohistochimie, FISH, cellule myoépithéliale, cellule luminale.

SUMMARY AND KEY WORDS

Breast carcinomas with myoepithelial/basal characteristics are still very poorly defined and understood; they remain an obscure entity, and are still largely ignored in clinical practice. Since the advent of genetic profiling technologies, basal breast carcinoma is now considered a rather frequent and aggressive entity, which does not respond well to conventional treatment. Nevertheless, since the basal breast carcinoma is still poorly defined and characterized as an entity, data obtained from cDNA microarrays studies needs to be validated with conventional pathology methods. The aim of our study was to better characterize these tumors, by histology, immunohistochemistry and FISH. We have retrospectively selected over 100 breast carcinoma cases from the tissue bank of CHUM. We have constructed tissue microarrays from corresponding paraffin tumor blocks. The staining pattern based on CK5, CK14, CK17, α -SMA and HER-1 has allowed us to detect positive staining for these markers in a number of these tumors. Most, but not all positive tumors, are hormone receptor negative, and most, but not all, are also HER2 negative by FISH. Most of them have a non amplified topoisomerase status. The pattern of staining varies between tumors. Some basal tumors co-express luminal markers (EMA, CK19), whereas other tumors do not. The main morphologic characteristics of basal tumors which we have identified are: large areas of necrosis, pronounced inflammation and desmoplastic stromal reaction. Some cases showed a particularly aggressive outcome.

Our results underline the complexity of the basal breast carcinoma, which is quite frequent among breast cancers at CHUM. We therefore underscore the need of further characterizing this entity so that the treatment of this particularly aggressive carcinoma can be optimized.

Key words: cancer, tissue microarrays, histology, immunohistochemistry, FISH, myoepithelial breast cell, luminal breast cell.

TABLE DE MATIERES

<i>RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS</i>	3
<i>SUMMARY AND KEY WORDS</i>	5
<i>TABLE DE MATIERES</i>	7
<i>INDEX DES TABLEAUX</i>	12
<i>INDEX DES FIGURES</i>	14
<i>LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS</i>	18
<i>INTRODUCTION</i>	22
I. LE SEIN	22
II. LE CANCER DU SEIN	23
II.1 Introduction	23
II.2 Les carcinomes du sein.....	23
II.3 Les récepteurs hormonaux.....	26
II.4 HER-2 et cancer du sein.....	26
II.5 Topoisomérase 2A et cancer du sein.....	28
III. LE CANCER DE PHÉNOTYPE BASAL.....	30

III.1 Introduction.....	30
III.2 Caractérisation de la couche basale	31
III.3 Les carcinomes mammaires d'origine myoépithéliale.....	33
III.4 Les carcinomes mammaires de phénotype basal	34
IV. LES MICROMATRICES TISSULAIRES	37
<i>HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE</i>	39
<i>MATÉRIEL ET MÉTHODES</i>	42
I. SELECTION DES PATIENTES.....	42
I.1 Comité d'éthique	42
I.2 Sélection des cas	43
II. ANALYSE DES TUMEURS.....	45
III. SELECTION DES BLOCS TUMORAUX ET CONFECTION DES LAMES HISTOLOGIQUES	46
IV. CARACTERISATION DE LA COHORTE PRELIMINAIRE PAR IHC..	47
IV.1 Introduction.....	47
IV.2 Immunohistochimie manuelle sur lames	47

V. CARACTERISATION DE LA COHORTE FINALE/ CONSTRUCTION D'UNE MICROMATRICE TISSULAIRE (MMT), IHC ET FISH	52
V.1 Généralités sur la construction de la MMT à partir de l'appareil manuel MTA-1 de Beecher	53
V.2 Réalisation de notre MMT	57
V.3 Caractérisation tumorale par IHC sur MMT	62
V.4 Caractérisation tumorale par FISH sur MMT	69
VI. ANALYSE STATISTIQUE	74
RÉSULTATS	75
I. COHORTE PRELIMINAIRE: RÉSULTATS PRELIMINAIRES	75
I.1 Composition de la cohorte	75
I.2 Identification des cancers basaux	75
I.3 Données morphologiques et cliniques des cancers basaux de la cohorte préliminaire	79
I.4 Figures	80
II. RÉSULTATS DE LA COHORTE FINALE	82
II.1 Analyse pathologique	82

II.2 Résultats en IHC sur MMT	89
II.3 Analyse statistique.....	94
II.4 Carcinome in situ et marqueurs basaux.....	97
II.5 Données morphologiques des tumeurs avec des caractéristiques basales en IHC	98
II.6 Illustrations	98
III. CARACTERISATION DES TUMEURS PAR FISH	153
III.1 Récapitulation des résultats pour le FISH TOPO2A et HER-2	153
III.2 HER-2	155
III.3 TOPO2A	157
III.4 Illustrations	160
SOMMAIRE DES RÉSULTATS	162
DISCUSSION.....	166
I. GÉNÉRALITÉS.....	166
II. CARACTERISATION DU PHENOTYPE BASAL EN IHC ET FISH.....	169
III. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES CARCINOMES BASaux	172

IV. SPECTRE LESIONNEL DES CARCINOMES BASAUX	174
V. ORIGINE DES CARCINOMES BASAUX	177
VI. SIGNIFICATION CLINIQUE DES MARQUEURS BASAUX	181
VII. LA TOPOISOMERASE 2A DANS LE CARCINOME DE PHENOTYPE BASAL	183
VIII. LES MMT ET L'ETUDE DES CARCINOMES MAMMAIRES	184
<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	<i>189</i>

INDEX DES TABLEAUX

<i>Tableau I : Classification et fréquence relative des carcinomes mammaires</i>	<i>24</i>
<i>Tableau II Marqueurs ciblés en IHC pour la cohorte préliminaire.....</i>	<i>48</i>
<i>Tableau III. Description des Antigènes cibles (première partie)</i>	<i>63</i>
<i>Tableau III. Description des Antigènes cibles (deuxième partie)</i>	<i>64</i>
<i>Tableau IV: Marqueurs ciblés en IHC pour la cohorte "finale".....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau V: Évaluation des résultats</i>	<i>68</i>
<i>Tableau VI: Récapitulation des résultats de la cohorte préliminaire</i>	<i>78</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (première partie).....</i>	<i>82</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (deuxième partie)</i>	<i>83</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (troisième partie)</i>	<i>84</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (quatrième partie).....</i>	<i>85</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (cinquième partie)</i>	<i>86</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (sixième partie).....</i>	<i>87</i>
<i>Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (septième partie).....</i>	<i>88</i>
<i>Tableau VIII: Récapitulation des données en IHC et FISH (HER-2) pour la cohorte finale.....</i>	<i>91</i>
<i>Tableau IX: Résultats en IHC de la cohorte finale (première partie)</i>	<i>92</i>

Tableau IX: Résultats en IHC de la cohorte finale (deuxième partie)..... 93

***Tableau X: Récapitulation des résultats pour le FISH TOPO2A et HER-2
(première partie)..... 153***

***Tableau X: Récapitulation des résultats pour le FISH TOPO2A et HER-2
(deuxième partie)..... 154***

INDEX DES FIGURES

<i>Figure 1: Appareil l'appareil manuel MTA-1 de Beecher</i>	<i>52</i>
<i>Figure 2: Fabrication de la MMT.....</i>	<i>60</i>
<i>Figure 3: Résultats en IHC, cas 35 1^{ère} cohorte.</i>	<i>80</i>
<i>Figure 4: Cas 24 et 72 de la 1^{ère} cohorte.</i>	<i>81</i>
<i>Figure 5 : Cas 1 (première partie).....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 5 : Cas 1 (deuxième partie).....</i>	<i>101</i>
<i>Figure 6 : Cas 2 (première partie).....</i>	<i>102</i>
<i>Figure 6 : Cas 2 (deuxième partie).....</i>	<i>103</i>
<i>Figure 7 : Cas 5 (première partie).....</i>	<i>104</i>
<i>Figure 7 : cas 5 (deuxième partie).....</i>	<i>105</i>
<i>Figure 8 : Cas 11 (première partie).....</i>	<i>106</i>
<i>Figure 8 : Cas 11 (deuxième partie).....</i>	<i>107</i>
<i>Figure 9 : Cas 12 (première partie).....</i>	<i>108</i>
<i>Figure 9 : Cas 12 (deuxième partie).....</i>	<i>109</i>
<i>Figure 10 : Cas 13 (première partie).....</i>	<i>110</i>
<i>Figure 10 : Cas 13 (deuxième partie).....</i>	<i>111</i>
<i>Figure 11 : Cas 15 (première partie).....</i>	<i>112</i>

<i>Figure 11 : Cas 15 (deuxième partie).....</i>	<i>113</i>
<i>Figure 12 : Cas 16 (première partie).....</i>	<i>114</i>
<i>Figure 12 : Cas 16 (deuxième partie).....</i>	<i>115</i>
<i>Figure 13 : Cas 18 (première partie).....</i>	<i>116</i>
<i>Figure 13 : Cas 18 (deuxième partie).....</i>	<i>117</i>
<i>Figure 14 : Cas 19.....</i>	<i>118</i>
<i>Figure 15 : Cas 20 (première partie).....</i>	<i>119</i>
<i>Figure 15 : Cas 20 (deuxième partie).....</i>	<i>120</i>
<i>Figure 16 : Cas 21 (première partie).....</i>	<i>121</i>
<i>Figure 16 : Cas 21 (deuxième partie).....</i>	<i>122</i>
<i>Figure 17 : Cas 23 (première partie).....</i>	<i>123</i>
<i>Figure 17 : Cas 23 (deuxième partie).....</i>	<i>124</i>
<i>Figure 18 : Cas 24.....</i>	<i>125</i>
<i>Figure 19 : Cas 25 (première partie).....</i>	<i>126</i>
<i>Figure 19 : Cas 25 (deuxième partie).....</i>	<i>127</i>
<i>Figure 20 : Cas 27 (première partie).....</i>	<i>128</i>
<i>Figure 20 : Cas 27 (deuxième partie).....</i>	<i>129</i>
<i>Figure 21 : Cas 28.....</i>	<i>130</i>
<i>Figure 22 : Cas 29 (première partie).....</i>	<i>131</i>

<i>Figure 22 : Cas 29 (deuxième partie).....</i>	<i>132</i>
<i>Figure 23: Cas 30 (première partie).....</i>	<i>133</i>
<i>Figure 23 : Cas 30 (deuxième partie).....</i>	<i>134</i>
<i>Figure 24 : Cas 32 (première partie).....</i>	<i>135</i>
<i>Figure 24 : Cas 32 (deuxième partie).....</i>	<i>136</i>
<i>Figure 25 : Cas 33 (première partie).....</i>	<i>137</i>
<i>Figure 25 : Cas 33 (deuxième partie).....</i>	<i>138</i>
<i>Figure 26 : Cas 37 (première partie).....</i>	<i>139</i>
<i>Figure 26 : Cas 27 (deuxième partie).....</i>	<i>140</i>
<i>Figure 27 : Cas 38 (première partie).....</i>	<i>141</i>
<i>Figure 27 : Cas 38 (deuxième partie).....</i>	<i>142</i>
<i>Figure 28 : Cas 43 (première partie).....</i>	<i>143</i>
<i>Figure 28 : Cas 43 (deuxième partie).....</i>	<i>144</i>
<i>Figure 29 : Cas 44 (première partie).....</i>	<i>145</i>
<i>Figure 29 : Cas 44 (deuxième partie).....</i>	<i>146</i>
<i>Figure 30 : Cas 50 (première partie).....</i>	<i>147</i>
<i>Figure 30 : Cas 50 (deuxième partie).....</i>	<i>148</i>
<i>Figure 31 : Cas 58 (première partie).....</i>	<i>149</i>
<i>Figure 31 : Cas 58 (deuxième partie).....</i>	<i>150</i>

<i>Figure 32 : Cas 67 (première partie).....</i>	<i>151</i>
<i>Figure 32 : Cas 67 (deuxième partie).....</i>	<i>152</i>
<i>Figure 33. Carcinome négatif pour le phénotype basal, présentant une amplification du gène HER-2 et du gène de la topoisomérase 2A (cas 61).....</i>	<i>160</i>
<i>Figure 34. Carcinome basal présentant une amplification du gène HER-2 et de la topoisomérase 2A (cas 44).....</i>	<i>161</i>
<i>Figure 35: Carcinome basal ne présentent pas d'amplification du gène HER-2 ni du gène de la topoisomérase 2A (cas 13).</i>	<i>161</i>

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ADN: acide desoxy ribonucleique.

a-SMA : alpha actine du muscle lisse

β 4 integrine: sous-unité d'intégrine beta 4

CHUM: Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

CB: cellule basale/myoépithéliale

CD10: marqueur de différenciation (*cluster of differentiation*) 10.

CGH: hybridation génomique comparative.

CIS: carcinome in situ

CK : cytokératine

CK5: cytokératine 5

CK14: cytokératine 14

CK17: cytokératine 17

CK19 : cytokétarine 19

CL: cellule luminale

DAPI: 4',6 diamidino-2-pheylinode

EGFR/HER1 : récepteur du facteur de croissance épithéliale1

EMA : antigène épithélial membranaire

ET-OH: éthanol

ER: récepteur d'œstrogène

FDA: *Food and Drug Administration*

FISH: hybridation in situ en fluorescence

GATA-3: protéine GATA-3

IHC: immunohistochimie

H&E: coloration à l'hématoxiline-eosine

HPS: Coloration à l'hématoxiline-phloxine-safran

HER-2 : récepteur du facteur de croissance épithélial type 2.

Kb: Kilo bases

KD: Kilo dalton

ME: microscopie électronique.

MMT: micromatrice tissulaire.

PR : récepteurs de progestérone.

PBS : tampon phosphate salin

PERe: peroxidase endogène

p53: protéine du cycle cellulaire 53.

p63: protéine du cycle cellulaire 63.

SBR : score de Scarff Bloom Richardson

S100 : protéine S-100

T, N, M: Classification du stade tumoral par la taille de la tumeur (T), la présence de métastases ganglionnaires (N), la présence de métastases dans des organes solides (M).

TOPO2A: topoisomérase 2A.

À toutes les femmes que j'aime qui ont souffert du cancer du sein.
À toutes celles qui pourraient un jour en souffrir.

Je remercie les membres de mon laboratoire: Dr Louis Gaboury, Denis Rodrigue et Dr Francine Jolicoeur, pour leur soutien, la formation scientifique que j'ai acquise à leur côté, et leur amitié chaleureuse et sincère.

Je remercie mes codirectrices Dr Danuta Balicki et Dr Isabelle Gorska, ainsi que les membres de leur équipe, pour leur disponibilité et leur motivation dans leur implication dans ma recherche.

Je remercie mes collaborateurs, Dr Robert Audet et Julie Blackburn avec qui ce fut un plaisir de travailler.

Je remercie Christian Charbonneau pour sa générosité et son expertise indispensable.

Je remercie mes amis, d'ici et d'ailleurs, présents à chaque instant de ma vie.

Je remercie mes parents, mes frères et ma sœur ainsi que le reste de ma famille, pour leur amour infini et la foi qu'ils portent en moi.

Je remercie David, pour rendre chaque instant plus magique.

INTRODUCTION

I. LE SEIN

Le sein est la glande responsable de la production du lait maternel. Cette dernière assure à la fois une alimentation complète et procure une protection immunologique au nourrisson.

La glande mammaire se divise en lobes, eux-mêmes constitués de lobules, contenant les canaux tubuloalvéolaires. Chaque lobe est drainé par un canal galactophore qui se jette à son tour au niveau des sinus lactifères à l'extrémité du mamelon. Les canaux sont bordés de deux couches de cellules épithéliales: une première couche, interne, faite de cellules continues, appelées cellules luminales; une seconde couche, externe, constituée de cellules discontinues, les cellules basales/myoépithéliales. Les cellules basales synthétisent la lame basale, qui s'interpose entre le tissu épithélial et le tissu conjonctif mammaire. Le tissu conjonctif interlobulaire se compose surtout de collagène, d'adipocytes, et d'un derme réticulaire. Le tissu conjonctif intralobulaire est pauvre en collagène mais riche en cellules telles que les fibroblastes et les myofibroblastes. La glande mammaire subit des changements cycliques parallèles au cycle menstruel, et se métamorphose au gré des différentes périodes hormonales de la vie de la femme (puberté, vie adulte, grossesse, et ménopause).

II. LE CANCER DU SEIN

II.1 Introduction

Le cancer du sein est le cancer le plus prévalent chez la femme, et une des premières causes de morbidité et de mortalité dans la population féminine. Actuellement, tant en Europe qu'en Amérique, une femme sur neuf en est atteinte, et 30% d'entre elles succombent à la maladie. Malgré d'énormes progrès dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent l'apparition et la progression du cancer du sein, cette maladie, demeure complexe, hétérogène, et encore mal comprise. La nomenclature et la classification actuelle des cancers se basent sur le tissu et le type cellulaire qui donne naissance à la tumeur. Comme la plupart des cancers mammaires proviennent des cellules épithéliales, ce sont des carcinomes. Les sarcomes du sein (leiomyosarcomes, adenomyoépithéliomes malins etc.) sont beaucoup plus rares, et les lymphomes exceptionnels.[1]

II.2 Les carcinomes du sein

En 2001, 240,000 femmes ont reçu un diagnostic de carcinome mammaire, 40,000 en sont décédées. L'incidence de la maladie semble croître; deux principaux facteurs sont invoqués: le vieillissement de la population, et les grossesses moins nombreuses et survenant à des âges plus avancés [2-5].

Les carcinomes sont rangés en deux catégories : les carcinomes *in situ* (confinés aux canaux et aux lobules par une membrane basale), et les carcinomes invasifs (envahissant le stroma).

La classification histologique classique des types les plus fréquents figure au tableau 1.

Tableau 1 : Classification et fréquence relative des carcinomes mammaires

Type de carcinome invasif	Distribution
Canalaire	79%
Lobulaire	10%
Tubulaire	6%
Mucineux	2%
Médullaire	2%
Papillaire	1%
Métaplasique	<1%

La classification actuelle des carcinomes repose sur des critères descriptifs purement histopathologiques. Les **carcinomes canauxaux**, de loin les plus fréquents, sont ainsi appelés car ils proviendraient des cellules canauxaux du sein.

De même, les carcinomes **tubulaires** sont des carcinomes formant des cordons et des tubules réguliers entourés d'un stroma abondant et fibreux. Le carcinome **médullaire** au contraire est bien circonscrit et se compose de cellules beaucoup plus indifférenciées, déposées dans un stroma peu abondant mais particulièrement inflammatoire. Enfin, les carcinomes **lobulaires** se caractérisent par des minces cordons de cellules cancéreuses disposées en file indienne [1].

Par ailleurs, on admet généralement que les carcinomes proviennent quasi exclusivement des cellules luminales, et non des cellules de la couche basale, qui ne se transformeraient qu'exceptionnellement en cellules malignes [6].

La prise en charge dépend essentiellement du diagnostic et des facteurs pronostics du patient. L'agressivité de la tumeur est évaluée par des critères essentiellement histopathologiques (le grade SBR, la taille de la tumeur, l'envahissement des ganglions lymphatiques, la présence des métastases). Ces critères conduisent à la formulation du stade de la tumeur (I-IV) selon la classification TNM, où le T réfère à la taille de la tumeur, le N au nombre de ganglions envahis, et le M à la présence ou l'absence de métastases.

Malheureusement, la prise en charge ne tient pas toujours compte du type histologique de la tumeur, et demeure dans l'ensemble assez peu individualisée. Malgré d'énormes progrès dans la compréhension du cancer du sein à l'échelon moléculaire, peu de marqueurs ont actuellement un impact clinique dans la prise en charge des patients.

Le traitement de base du cancer du sein ressemble à celui des autres adénocarcinomes: chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie dépendant du stade T, N, M de la tumeur et de l'espérance de vie du patient.

Selon le dernier consensus annuel de St-Gallen (assemblée de spécialistes du cancer du sein d'envergure internationale) seulement deux marqueurs biologiques sont pris en compte dans la prise en charge clinique de la maladie : les **récepteurs hormonaux** et le statut de **HER-2** [7].

II.3 Les récepteurs hormonaux

Environ 70% des cancers du sein expriment les récepteurs d'œstrogènes et de progestérone. Ce sont des tumeurs moins agressives et répondant généralement à l'hormonothérapie.

Les patientes qui expriment des récepteurs hormonaux peuvent bénéficier d'une hormonothérapie. Plusieurs molécules ont été développées à cet égard: le *tamoxifène* (agoniste partiel des récepteurs d'œstrogènes), l'*anastrozole* (inhibiteur d'aromatase), les *analogues de GnRH* [8].

II.4 HER-2 et cancer du sein

HER-2 est un récepteur tyrosine kinase sur-exprimée dans 25 à 30% des cancers du sein. La plupart du temps, il s'agit d'une amplification du gène au niveau de son locus 17q11-12. Son rôle oncogénique est bien reconnu *in vitro* [9, 10] et *in vivo* [11, 12].

Depuis 1987, 81 études cliniques ont étudié le rôle de l'amplification de HER-2 dans le cancer du sein. Les conclusions de ces études sont les suivantes :

- 25 à 30 % des cancers du sein surexpriment et/ou montrent une amplification de HER-2.
- 92% des études concluent que l'amplification de HER-2 est associée à un mauvais pronostic.
- Dans 71% des études, HER-2 est un facteur indépendant de mauvais pronostic.
- L'amplification de HER-2 est associée à:
 - Un stade tumoral avancé
 - Une faible différenciation cellulaire
 - Une perte d'expression de récepteurs hormonaux par les cellules néoplasiques, et donc une résistance accrue à l'hormonothérapie
 - Une pré-ménopause
 - Un index de prolifération cellulaire élevé
 - Un plus grand risque de récurrence de la maladie
 - Une survie plus courte.

La découverte du gène HER-2 et de la surexpression de cette protéine, ont permis deux innovations majeures durant les quinze dernières années pour la prise en charge des patientes. D'une part, l'amplification d'HER-2 est devenue un

biomarqueur tissulaire de mauvais pronostic et est recherchée en routine dans les carcinomes mammaires ; d'autre part, depuis 1998, le *trastuzumab* (*Herceptin*®), un anticorps monoclonal humanisé, est devenu une option thérapeutique de choix pour les patients ayant une amplification de l'oncogène HER-2. Actuellement d'autres agents thérapeutiques sont aussi à l'étude : inhibiteurs des tyrosines kinases, antagonistes des tyrosines kinases etc. [8, 12-14].

Par ailleurs, de nombreuses études ont suggéré que les patientes porteuses de tumeurs ayant une amplification de HER-2 pourraient bénéficier des régimes de chimiothérapie composés d'anthracyclines [15, 16].

II.5 Topoisomérase 2A et cancer du sein

Les topoisomérases sont des enzymes nucléaires qui facilitent la transcription, la duplication, et la recombinaison de l'ADN.

La topoisomérase 2A aurait un rôle vital lors de la ségrégation et la condensation des chromosomes, ainsi qu'au moment de la torsion et de la compaction de l'ADN [17, 18].

Par ailleurs, les topoisomérases sont aussi la cible de nombreux agents chimiothérapeutiques, comme les anthracyclines, les épipodophyllotoxines, l'actinomycine etc. Les anthracyclines sont considérées comme des agents thérapeutiques de choix contre les carcinomes mammaires de mauvais pronostic, et, particulièrement, envers les carcinomes ayant une amplification de HER-2.

Des études *in vitro* ont montré que la sensibilité des cellules cancéreuses aux agents inhibiteurs des topoisomérases est dépendante du niveau d'expression des topoisomérases dans la cellule. Depuis, les topoisomérases sont considérées comme des marqueurs potentiels de la réponse à ces agents thérapeutiques [19-21].

Le gène de la topoisomérase 2A est situé à seulement quelques kilobases (kb) du gène HER-2, au locus 17q21. La co-amplification des deux gènes a été décrite dans de nombreuses études. Selon certaines de ces études, 15 à 50 % des tumeurs qui présentent une amplification de HER-2, présentent aussi une co-amplification du gène de la topoisomérase [22-24]. Des publications récentes affirment que les topoisomérases ont un rôle prépondérant pour prédire la sensibilité aux anthracyclines dans les tumeurs avec amplification de HER-2 [25]. Actuellement, plusieurs études multicentriques sont en cours pour déterminer le rôle du statut de la topoisomérase dans la prise en charge du carcinome mammaire [26].

En conclusion, actuellement, malgré la grande hétérogénéité du cancer du sein, seulement deux paramètres biologiques influencent le traitement des femmes atteintes: la présence ou l'absence d'expression des récepteurs stéroïdiens; et l'amplification de HER-2. Le statut des topoisomérases au sein des cellules tumorales pourrait aussi devenir un outil d'orientation du choix du traitement.

Actuellement, la sélection du cocktail radio/chimiothérapeutique ne tient pas suffisamment compte de l'hétérogénéité des carcinomes.

Tout de même, depuis l'introduction des antistéroïdiens et du trastuzumab, la courbe de survie des femmes atteintes d'un cancer du sein s'est favorablement redressée.

Malheureusement, il y a encore peu d'outils thérapeutiques disponibles pour les femmes atteintes de carcinomes qui n'expriment pas les récepteurs stéroïdiens et qui ne répondent pas à l'Herceptin. Leur risque de mortalité reste le plus sombre et, des progrès dans la prise en charge de ces tumeurs apparaissent nécessaires pour améliorer leurs chances de survie.

III. LE CANCER DE PHÉNOTYPE BASAL

III.1 Introduction

Dès la 21^{ème} semaine de vie intra-utérine [27, 28], le tissu épithélial du sein se compose de deux couches distinctes: une couche interne, la couche luminale, et une couche externe, juxtaposée à la membrane basale: la couche basale.

Chez l'adulte, la couche basale prends un aspect hétérogène : les cellules sont tantôt cubiques, tantôt fusiformes. Elles forment une couche parfois continue mais souvent discontinue selon leur position dans l'arbre mammaire et l'environnement hormonal du tissu. Les principales cellules composant cette couche basale sont les cellules myoépithéliales. Le terme utilisé pour dénommer ces cellules reflète leur double 'personnalité': ce sont des cellules épithéliales, douées de propriétés

contractiles. Elles expriment donc aussi bien les cytokératines que des protéines contractiles telles que l' α SMA, la myosine, et la calponine [28, 29].

La constitution exacte de cette couche basale reste à ce jour encore mal documentée, la littérature s'étant portée davantage sur la couche luminale. Effectivement, jusqu'à tout récemment, les cellules luminales ont été considérées comme les protagonistes quasi absolues aussi bien de la physiologie de l'arbre glandulaire mammaire, que de la pathologie cancéreuse du sein.

Deux nouvelles avenues de recherche ont réveillé l'intérêt des spécialistes du sein pour la couche basale. Tout d'abord, la possibilité d'y retrouver d'autres types cellulaires en plus des cellules myoépithéliales (des cellules souches ou progénitrices, des cellules intermédiaires) [30-32]. Ensuite, l'identification du carcinome mammaire de phénotype basal, récemment identifié par des études de profil génétique [33].

Dans notre exposé, nous allons utiliser le terme de "cellules basales", ou de "cellules de la couche basale", pour nous référer, essentiellement aux cellules myoépithéliales, sans exclure la possibilité qu'il puisse aussi s'agir d'autres types cellulaires, comme des cellules progénitrices des cellules épithéliales, ou des cellules de différenciation intermédiaire.

III.2 Caractérisation de la couche basale

Le terme "basal" a été d'abord utilisé par Moll et collègues [34], pour se référer aux populations de cellules qui expriment certaines CK de haut poids moléculaire,

après description par analyse en gel bidimensionnel, du catalogue des CK humaines dans divers épithéliums normaux et tumoraux.

C'est ainsi que l'expression des CK 5,14 et 17 a été retrouvée préférentiellement dans les couches basales de beaucoup d'épithéliums glandulaires, dont celui du sein. En revanche, les CK 8 et 18 ont été principalement observées au niveau des cellules luminales. [34] Comme discuté précédemment, les cellules luminales ont toujours été considérées à l'origine de la grande majorité de carcinomes mammaires. La couche basale forme normalement une couche continue autour des foyers de carcinomes *in situ*, disparaissant lors de l'apparition des foyers de carcinome invasifs. En conséquence, la détection de la couche basale a connu un intérêt diagnostique dans la pratique pathologique depuis quelques années: sa présence permet de poser un diagnostic de carcinome *in situ*, son absence indiquant plutôt le caractère envahissant d'une lésion.

L'identification des cellules basales s'est tout d'abord faite à l'aide de la microscopie électronique, par la reconnaissance des protéines contractiles filamenteuses dans le cytoplasme des cellules (présence de myofilaments, de tonofilaments).[35] Depuis l'arrivée de l'IHC, leur détection en microscopie optique est devenue beaucoup plus facile. En effet, comme la détection avec les colorations usuelles est ardue, même malgré leur morphologie cuboïdale ou fusiforme, l'IHC est devenue indispensable pour le pathologiste. L'identification des cellules myoépithéliales en IHC au moyen d'anticorps commercialement disponibles (particulièrement l' α SMA) est devenue, au fil des ans, une pratique

courante dans les départements de pathologie hospitaliers. Selon des études récents, plusieurs antigènes identifient les cellules myoépithéliales: la aSMA, la vimentine, la relaxine, l'oxytocine, la myosine, la tropomyosine, le CD10, la S100, la p63, la β 4intégrine, les CK basales etc. [36-40] Les dernières avancées dans la connaissance des cellules de la couche basale ont été apportées par les études par profil génétique; ces dernières permettant de mieux connaître et comprendre leur bagage génétique [28, 41].

Mais malgré ces nouveaux développements, le type cellulaire basal reste encore mal connu.

L'hétérogénéité et la plasticité de ces cellules, tant à l'état physiologique que pathologique, rendent l'interprétation des résultats en IHC et en profil génomique difficile. Actuellement, le cocktail d'antigènes le plus sensible et spécifique pour caractériser les cellules de la couche basale reste à déterminer.

III.3 Les carcinomes mammaires d'origine myoépithéliale

La plupart des lésions du sein prenant naissance des cellules myoépithéliales sont des lésions bénignes [42]. L'existence de carcinomes mammaires d'origine myoépithéliale a été reconnue mais considérée exceptionnelle. Plusieurs entités distinctes ont été décrites: le **carcinome myoépithélial**, la **tumeur adénomyoépithéliale**, le **carcinome adénoïde kystique** [43], le **carcinome peu différencié riche en cellules myoépithéliales** [44-46]. Le diagnostic repose sur des critères avant tout cytologiques et architecturaux: cellules fusiformes atypiques marquant en IHC pour les CK basales, l'aSMA, le S100, la vimentine etc. Les

altérations cytogénétiques les plus communes décrites touchent les chromosomes 11,16 et 17 [47, 48]. Il y a encore très peu des cas décrits dans la littérature, et la conduite à tenir à l'égard de ces cancers est mal définie. Tout de même, les rares études cliniques publiées reflètent leur caractère agressif et leur résistance à l'hormonothérapie et à la radiothérapie [27, 49-51]. L'évolution péjorative des patientes atteintes mériterait sans doute une meilleure documentation de ces lésions en dépit de leur rareté.

III.4 Les carcinomes mammaires de phénotype basal

Dans une ligne de pensée parallèle, de nombreuses études ont proposé l'existence d'un sous groupe de carcinomes conventionnels (canalaires, médullaires) présentant des caractéristiques de cellules basales/myoépithéliales.

Depuis les années 60, quelques études en microscopie électronique prétendent avoir retracé des cellules myoépithéliales, non reconnues en microscopie optique, au sein de carcinomes infiltrants [52]. Par ailleurs ces cellules ont aussi été observées dans les ganglions métastatiques de carcinomes mammaires [53], et identifiées comme une composante essentielle des carcinomes canauxaires avec réaction desmoplastique [54].

Malgré ces données, aucune étude n'a évalué leur valeur pronostique, et en parallèle, beaucoup d'autres études ont réfuté la possibilité d'une composante myoépithéliale/basale dans les carcinomes courants, d'après leur ultrastructure. Dans les revues les plus récentes de microscopie électronique (ME), les cellules

myoépithéliales restent une composante inexistante dans la plupart des carcinomes invasifs mammaires.[55].

Depuis les années 80, de nombreuses études en IHC souffrent de la nomenclature actuelle des carcinomes mammaires. Alors que les carcinomes mammaires d'origine myoépithéliale, reconnaissables en microscopie optique, semblent exceptionnels; les carcinomes mammaires courants (canalaires, médullaires, tubulaires) composés exclusivement de cellules luminales semblent beaucoup plus rares qu'on l'avait soupçonné. La composante basale/myoépithéliale (identifiée en IHC), participerait beaucoup plus souvent qu'attendu à la carcinogénèse, mais serait difficilement reconnaissable en microscopie optique. Plusieurs équipes caractérisant le profil immunohistochimique des carcinomes mammaires courants, ont reconnu la présence d'une composante basale/myoépithéliale dans plusieurs carcinomes, qui échappait à l'examen histologique de la tumeur. Diverses appellations ont été utilisées par les différentes équipes pour décrire ce phénomène: **carcinomes de phénotype basal** [56, 57], **carcinomes co-exprimant les CK basales et luminales** [58], **carcinomes de phénotype bimodal** [59], **carcinomes à phénotype myoépithélial** [60].

La signification clinique du phénotype basal reste unanimement de mauvais pronostic selon les études qui ont exploré les caractéristiques cliniques de ces tumeurs [57, 59, 61-63]. Par ailleurs, certaines études associent le phénotype basal

à des tumeurs de haut grade, [59, 64, 65] n'exprimant pas les récepteurs hormonaux, [57, 66, 67] et apparaissant chez des jeunes femmes [57, 64, 65].

Malgré ces nombreuses publications soulignant le besoin de réévaluer la classification et la prise en charge des carcinomes mammaires, l'impact clinique de ces études a été quasi nul: la composante basale/myoépithéliale des carcinomes mammaires a continué d'être ignorée, peu ou pas recherchée ni évaluée en pratique médicale.

L'importance des carcinomes mammaires de phénotype basal a finalement refait surface lors de l'arrivée des nouvelles technologies. Effectivement, les données apportées par les études par profil génomique (hybridation génomique comparative et puces à ADN) dévoilent de nouvelles perspectives. Aux yeux de la majorité des spécialistes du cancer du sein, le carcinome mammaire de phénotype basal prenait vraiment naissance.

Malgré certaines controverses et de nombreuses variations entre les diverse études, un nouveau consensus semble devoir s'établir: les carcinomes canalaire peuvent être classés en trois principales catégories selon leur profil d'expression génétique: les carcinomes ayant le profil d'expression des cellules luminales, les carcinomes ayant un profil d'expression propre aux cellules basales/myoépithéliales, et les carcinomes qui sur-expriment le gène HER-2 [33, 68-70].

D'après ces études, les carcinomes de phénotype basal sont caractérisés par un profil génique négatif pour les gènes des récepteurs hormonaux et le gène HER-2. On les appelle carcinomes à "phénotype triple négatif". Ils expriment des gènes normalement actifs dans les cellules de la couche basale, comme les gènes de la CK5, la CK17, la laminine, HER1 (33, 63) etc. Le taux de mutation de la p53 serait aussi plus élevé que pour les autres classes tumorales.

Avec les carcinomes du groupe HER-2, les carcinomes de phénotype basal auraient le plus sombre pronostic.

IV. LES MICROMATRICES TISSULAIRES

Le concept des micromatrices tissulaires est née en 1997: Juha Kononen, un étudiant au « *National Human Genome Research Institut* » cherchait alors une façon d'améliorer la validation des résultats obtenus par les puces à ADN [71, 72]. En effet, les avancées récentes dans l'analyse du transcriptome, la génomique et la protéomique, ont révolutionné le paysage de la recherche biomédicale. Ces nouvelles technologies, à haut débit, génèrent un nombre de données considérables; elles permettent d'analyser simultanément l'expression de milliers de gènes et de protéines dans un même tissu tumoral. Ces données nécessitent de toute évidence une validation morphologique. L'éventuelle utilisation des biopuces en clinique dépend de la qualité et de la rapidité des outils de validation sur des grandes séries.

La connaissance et la classification des différents types tumoraux, la localisation des patrons d'expression spécifiques, la recherche de marqueurs cliniques pertinents, et la stadification tumorale ont toujours fait appel aux compétences des pathologistes. Cependant, les outils dont ils disposaient jusqu'à maintenant freinaient toute avancée rapide leur permettant de suivre les apports des nouvelles techniques de biologie moléculaire: la pratique des coupes histologiques standards était trop archaïque et trop coûteuse pour caractériser des centaines, voir des milliers de gènes, avec des cohortes de plus en plus grandes de patients nécessaires pour valider ces données. Le passage à la grande échelle et au haut débit s'imposait donc comme une étape nécessaire au pathologiste du 21^{ème} siècle.

C'est dans ce contexte d'interdépendance entre le pathologiste et le biologiste moléculaire que la technique des micromatrices tissulaires a pris tout son essor [73-78].

En bref, il s'agit d'une technique à haut débit permettant d'obtenir des profils d'expression par immunohistochimie ou hybridation *in situ*, et de mesurer les niveaux d'amplification par FISH, à partir de tissus fixés, inclus en paraffine ou congelés. Une micromatrice tissulaire est un bloc de paraffine (appelé « receveur ») composé de plusieurs carottes provenant des divers blocs tissulaires distincts (« donneurs »). A partir d'un bloc de micromatrice tissulaire, on peut donc évaluer simultanément la présence ou l'absence d'une centaine de marqueurs dans plusieurs spécimens tumoraux.

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

Le cancer du sein est le carcinome le plus fréquent chez la femme, et une des principales causes de mortalité et morbidité. D'énormes progrès dans la prise en charge de la maladie au cours des derniers vingt ans ont permis une nette amélioration de la survie des patientes. Malheureusement, cette prise en charge reste insatisfaisante, particulièrement, pour les femmes atteintes des tumeurs de haut grade qui n'expriment pas les récepteurs hormonaux, et qui ne répondent pas au *trastuzumab* ou à d'autres médicaments anti-HER-2.

D'après les données de la littérature, les carcinomes ayant un phénotype basal identifiés en IHC, en CGH et par des puces à ADN, semblent beaucoup plus prévalents que ce qui a été reconnu jusqu'à récemment.

Il s'agirait de carcinomes de très mauvais pronostic, principalement de haut grade, n'exprimant pas les récepteurs hormonaux et répondant mal à la prise en charge classique des carcinomes mammaires. Peut-être pourraient-ils bénéficier d'une prise en charge particulière?

Actuellement il n'y a pas de consensus quant à la définition du carcinome basal en pathologie et en IHC. Or, nous pensons qu'il est primordial de mieux les caractériser. Les nouvelles technologies comme les puces à ADN sont intéressantes, mais elles sont très coûteuses et encore insuffisamment validées ou standardisées. Elles ne sont donc pas applicables en clinique courante pour le moment.

Nous estimons que les carcinomes mammaires ayant des caractéristiques basales en IHC sont fréquents, sous-estimés depuis longtemps, et encore mal connus. Les analyses pathologiques courantes ne permettent pas de les reconnaître. Par ailleurs, ces tumeurs représentent sans doute un groupe de cancers hétérogènes et complexes. Des études supplémentaires sont nécessaires pour caractériser et comprendre ces tumeurs, pour retrouver des stigmates du phénotype basal de pertinence potentielle, et pour évaluer l'ensemble du spectre lésionnel correspondant à ce type tumoral.

Les buts de notre projet étaient de mieux caractériser en IHC et en pathologie les carcinomes de type basal et d'évaluer la technique des micromatrices tissulaires à cet égard.

Nos objectifs spécifiques étaient les suivants :

- Identifier les carcinomes mammaires exprimant des caractéristiques IHC des cellules basales/myoépithéliales, en se basant sur les antigènes publiés dans la littérature où connus dans notre laboratoire (rfs thèse doctorale Dr Jolicoeur) : CK5, CK14, CK17, aSMA, HER1.
- Évaluer leur importance chez les patientes suivies au CHUM.
- Corréler ces données au type histologique, au statut hormonal et au statut HER-2 de la tumeur, ainsi qu'à l'âge des patientes.
- Analyser ces tumeurs d'un point de vue pathologique et clinique.

- Analyser la relation entre les marqueurs basaux et les marqueurs luminaux pour envisager l'origine cellulaire possible de ces tumeurs.
- Analyser la relation du phénotype basal avec l'amplification du gène de la topoisomérase 2A.
- Evaluer l'usage des micromatrices tissulaires pour ce propos et en pratique clinique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. SELECTION DES PATIENTES

I.1 Comité d'éthique

Conformément aux articles 19.1 et 19.2 de la *Loi sur les services de santé et les services sociaux*, la présente étude a reçu l'approbation du directeur des services professionnels du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), et des comités d'évaluation scientifique et d'éthique de la recherche du CHUM.

Le Comité d'évaluation scientifique (composé d'un directeur, sept chercheurs et du chef pharmacien du CHUM) évalue la pertinence, la validité, et la compétence scientifique des chercheurs.

Le Comité d'Éthique de la Recherche (composé de cinq professionnels de la santé, d'un juriste, d'un consultant d'éthique et de deux membres de la collectivité), évalue les risques auxquels sont exposés les sujets, la préservation de leur dignité, la confidentialité de l'étude, les bénéfices de l'étude, les coûts économiques, et le consentement libre et éclairé des patients participant à l'étude.

I.2 Sélection des cas

Nous avons sélectionné rétroactivement deux cohortes de patientes traitées par chirurgie au CHUM, entre 2000 et 2005, pour un carcinome mammaire, et pour lesquelles des blocs de tissus fixés et enrobés en paraffine ont été archivés.

La sélection a été effectuée à partir des dossiers des patientes, plus spécifiquement à partir des rapports pathologiques des lésions mammaires traitées chirurgicalement.

Grâce aux rapports pathologiques et aux dossiers cliniques des patientes, pour chaque patiente choisie, nous disposons des informations suivantes:

- Âge de la patiente au moment du diagnostic.
- Données pathologiques au sujet du prélèvement chirurgical tumoral: taille de la tumeur si mesurable, type histologique diagnostiqué, grade mitotique, nucléaire et histologique évalué par le pathologiste rédigeant le rapport, envahissement ganglionnaire dans les cas où une exérèse ganglionnaire accompagnait l'exérèse tumorale, statut des récepteurs hormonaux et de HER2 par immunohistochimie.
- Données cliniques: prise en charge des patientes (type et régime de chimiothérapie/radiothérapie), compte rendu d'imagerie quant à la présence/apparition des métastases.

La première cohorte (cohorte préliminaire) nous a servi à recueillir nos résultats préliminaires et nous guider dans le choix des types tumoraux à étudier dans la deuxième cohorte pour optimiser l'étude des tumeurs basaux. Pour la première cohorte, les critères de sélection ont été modérément restrictifs. Nous avons voulu échantillonner des tumeurs appartenant à différents types histologiques, différents grades, avec ou sans expression des récepteurs hormonaux ou d'amplification de l'oncogène HER2.

La sélection de la deuxième cohorte a été beaucoup plus rigoureuse, tenant compte cette fois des résultats obtenus pour la première cohorte afin d'optimiser le nombre de carcinomes basaux dans l'échantillon. Elle se compose de carcinomes canaux et médullaires, majoritairement de haut grade, sans expression des récepteurs hormonaux ni amplification du gène HER2.

Cohorte "préliminaire" : 69 patientes opérées d'un carcinome mammaire au CHUM entre 2000 et 2005. Ces tumeurs ont servi à l'étude IHC des tumeurs avec trois marqueurs basaux.

Cohorte "finale" : 68 patientes opérées d'un carcinome mammaire au CHUM entre 2000 et 2005. Leurs spécimens tumoraux ont servi à la construction d'une micromatrice tissulaire, caractérisée en IHC (dix marqueurs) et en FISH (deux marqueurs).

II. ANALYSE DES TUMEURS

Les tissus de patientes archivés au CHUM ont été fixés et enrobés en paraffine de manière courante; ils ont été conservés sous forme de blocs de paraffine et sont donc adéquats pour une étude rétrospective par immunohistochimie, même après quelques mois ou années (contrairement à des tissus déjà débités). Pour chaque bloc de paraffine des coupes histologiques colorées à l'HPS ont été confectionnées dans le département de pathologie pour permettre l'analyse histologique correspondant à chaque bloc tumoral.

Chaque cas sélectionné dans les deux cohortes a été réexaminé et réévalué au point de vue pathologique.

Pour la cohorte "finale", tous les blocs tumoraux ont été caractérisés pour chaque patiente. Ceci d'une part pour récolter le maximum d'information pathologique accompagnant chaque tumeur, mais aussi pour sélectionner un ou deux blocs tumoraux représentatifs par patiente pour la construction des micromatrices tissulaires et pour le marquage immunohistochimique. (Voir ci dessous)

Par ailleurs, nous disposions, pour chaque tumeur, des lames avec leurs marquages immunohistochimiques originaux réalisés au CHUM pour les antigènes ER (récepteurs d'estrogène), PR (récepteurs de progestérone), HER2 (oncogène HER2). Ces marquages ont été réalisés en pratique clinique courante car ils guident la prise en charge des patientes (cf. intro).

Caractéristiques histologiques recherchées systématiquement pour chaque tumeur mammaire

- ✓ Type histologique
- ✓ Taille
- ✓ Grades nucléaire-mitotique-histologique (Grade SBR)
- ✓ Aspect du stroma
- ✓ Présence ou absence de carcinome in situ: type (comédonien, solide, cribriforme), et pourcentage de la tumeur correspondant à du CIS.
- ✓ Invasion lymphatique, sanguine, nerveuse, cutanée
- ✓ Angiogénèse
- ✓ Composante inflammatoire
- ✓ Calcifications
- ✓ Nécrose punctiforme, nécrose centrale
- ✓ Présence d'autres anomalies mammaires non tumorales (changements fibrokystiques, adénose, etc.)

III. SELECTION DES BLOCS TUMORAUX ET CONFECTION DES LAMES HISTOLOGIQUES

Un à deux blocs tumoraux ont été sélectionnés pour chaque patiente dans nos deux cohortes. Nous avons sélectionné les blocs contenant la plus haute densité

tumorale, et une épaisseur satisfaisante. En cas d'hétérogénéité tumorale, les zones de plus haut grade tumoral et de caractère invasif ont été sélectionnés en priorité.

Des coupes des blocs tumoraux sélectionnées pour chaque patiente ont été colorées à l' HPS (Hématoxyline – Phloxine – Safran).

IV. CARACTERISATION DE LA COHORTE PRÉLIMINAIRE PAR IHC

IV.1 Introduction

L'IHC est une technique utilisée en pathologie courante depuis plus de 30 ans. Elle contribue de manière routinière au diagnostic et à l'évaluation des lésions tissulaires par les pathologistes cliniciens.

IV.2 Immunohistochimie manuelle sur lames

Les marquages immunohistochimiques effectués sur des coupes des blocs tumoraux (technique de peroxydase indirecte) ont été révélés à l'aide du chromogène 3,3-diaminobenzidine (Sigma Chemical Co.). Nous avons ciblé les marqueurs de phénotype basal inscrits au Tableau II.

Tableau II Marqueurs ciblés en IHC pour la cohorte préliminaire

Marqueur	Anticorps primaire	Fabricant	Dilution	Conditions de travail	Tissus de contrôle
α-SMA	1A4	DAKO	1: 500	P, EnV	Côlon
Kératine 14	LL002	Sérotec Ltd	1: 10	P, MO, LSAB2	Peau
Kératine 17	E3	DAKO	1: 20	P, MO, LSAB2	Prostate

Légende : **EnV**, trousse secondaire/tertiaire EnVision de DAKO; (**EZ**, pré-traitement enzymatique (10 minutes; pronase à 37°C)) **LSAB2**, trousse secondaire et tertiaire LSAB2 de DAKO; **MO**, pré-traitement au micro-ondes (tampon citrate, pH 6,0); **P**, sur tissus fixés, inclus en paraffine.

Technique d'immunohistochimie indirecte employant la peroxydase du raifort

Il est essentiel que les lames ne sèchent à aucune étape du processus:

coupes sont préalablement traitées au H_2O_2 3% (10 min pour bloquer la PERe), puis rincées à l'eau courante (5 min).

Pré-traitement au micro-ondes

Certains épitopes ciblés par des anticorps primaires semblent être partiellement ou totalement masqués au cours du processus de fixation/d'inclusion en paraffine des tissus. Le protocole suivant vise leur démasquage par la chaleur en milieu légèrement acide :

- 1- Les coupes sont placées, sous l'eau courante, dans un portoir de plastique de 25 places, les places vides étant au besoin comblées par des lames vierges;
- 2- 1000 ml de tampon citrate (pH 6) sont portés à ébullition au four micro-ondes (intensité maximale, 9 min) dans un presto fermé;
- 3- Les coupes sont immergées dans le presto; l'ensemble est placé au four micro-ondes (puissance maximale, 4 min);
- 4- Lorsque la pression interne a chuté, le presto est ouvert; les coupes y demeurent pour 15 min avant d'être doucement submergées dans un bain d'eau courante froide (5 min).

Technique d'immunohistochimie indirecte employant la peroxydase du raifort

Il est essentiel que les lames ne sèchent à aucune étape du processus:

- 1- Pendant que les lames sont encore dans l'eau, avec un crayon conçu à cet effet (Dakocytomation), encercler les zones sélectionnées (le cerne permet de retenir les solutions appliquées au niveau des tissus);
- 2- Rincer au PBS avec du Tween 20 (5 min);
- 3- Essuyer les lames une à une sur les côtés et le dessous avant d'y déposer la solution de «*protein blocking*» (Universal Blocking Solution, Dakocytomaton). Laisser incuber pour 5 min. Cette solution contribue à bloquer d'éventuels sites de liaison non spécifiques des anticorps primaires dans les tissus;
- 4- Verser l'excédent de sérum des lames et y déposer l'anticorps primaire (NE PAS rincer au PBS préalablement). Incubation de 1 heure (dans une boîte couverte, les lames ne devant pas sécher);
- 5- Rincer au PBS avec du Tween 20 (5 min);
- 6- Incubation avec le(s) réactif(s) secondaire/tertiaire utilisé(s) suivant les directives du fabricant (Trousse HRP Envision ou LSAB2; Dakocytomation) variant de 30 à 40 min;
- 7- Rincer au PBS avec du Tween 20 (5 min);
- 8- Incubation des coupes avec le DAB (Sigma Chemicals Co.) pour une durée variant de 3 à 7 min suivant les tissus, les antigènes et le chromogène considérés;
- 9- Rincer à l'eau courante (10 min).

N.B. Le Tween 20 est un détergent (Dako Tween 20 Reagent, Dakocytomation; utilisé selon les directives du fabricant); il favorise un étalement plus uniforme des solutions sur les tissus.

Dilution de travail des anticorps primaires

Les anticorps primaires sont dilués dans un tampon commercial (Antibody Diluting Buffer, Dakocytomation) et les solutions sont conservées à 4°C jusqu'à leur utilisation.

Contre-coloration

Nous utilisons une contre-coloration standard à l'hématoxyline de Harris.

Montage des lames

Les lames sont rincées dans des bains successifs d'ETOH 100% (2) et de toluène (2). Une goutte de colle soluble au xylène et une lamelle de verre sont déposées manuellement sur le tissu, à moins d'utiliser un appareil de montage à film préencollé (Tissue-Tek, Sakura Finetek U.S.A. Inc.).

Contrôle négative

Pour chaque réaction d'IHC des contrôles négatifs sont réalisés en appliquant le même protocole sans ajouter l'anticorps primaire.

V. CARACTERISATION DE LA COHORTE FINALE/ CONSTRUCTION D'UNE MICROMATRICE TISSULAIRE (MMT), IHC ET FISH



Figure 1: Appareil l'appareil manuel MTA-1 de Beecher

(Provenant du Laboratoire du Dr Gaboury)

V.1 Généralités sur la construction de la MMT à partir de l'appareil manuel MTA-1 de Beecher

1. Description de l'appareil

L'instrument consiste en une plate-forme contenant un réceptacle permettant de placer et de fixer le bloc de paraffine receveur, un pont pour fixer le bloc donneur, un poinçon pour retirer des carottes de paraffine du bloc receveur, un deuxième poinçon capable de retirer des carottes tissulaires à partir des blocs donneurs et de les insérer relativement facilement dans les orifices confectionnés dans le bloc receveur. Des vis micrométriques et des compteurs digitaux assurent le déplacement précis du support de poinçons à l'horizontale et à la verticale (guides X et Y).

2. Construction de la MMT

2.1 Préparation des blocs donneurs

Le repérage du site de carottage est essentiel; il est grandement responsable de la qualité de la micromatrice. En effet, il faut non seulement s'assurer que le prélèvement est effectué au sein de la tumeur (et non dans le tissu de soutien avoisinant, le tissu adipeux, ou autre); mais de plus, dans certains cas, le site d'intérêt concerne une zone tumorale spécifique. En cas d'hétérogénéité tumorale, nous avons décidé de sélectionner les zones de plus haut grade. Pour ce faire il faut réaliser des coupes histologiques colorées (HPS ou H&E) pour chaque bloc tumoral donneur. A partir des lames HPS nous avons localisé (et si nécessaire

repéré à l'aide d'un marqueur) les zones d'intérêt, et donc choisi, avec plus ou moins de précision, les zones de carottage dans le bloc de paraffine. Les blocs donneurs doivent avoir au moins 1mm d'épaisseur pour permettre la construction de la MMT. Tout de même, d'après notre expérience, des blocs de 3 à 4 mm d'épaisseur donnent des meilleurs résultats.

2.2 Préparation du bloc receveur (Bloc MMT)

Le bloc receveur consiste au début en un bloc de paraffine vierge: la paraffine liquide chauffée (55°C à 58°C) est versée dans un moule puis couverte d'une cassette. Une fois la paraffine solidifiée le moule peut être enlevé. Généralement on utilise de moules de 5 à 10 mm d'épaisseur.

2.3 Conception du MMT

Il faut planifier à l'avance le plan du MMT, notamment:

- Nombre de spécimens représentés dans la matrice
- Nombre de carottes par spécimen
- Localisation des carottes/spécimens dans la matrice
- Diamètre des carottes, distance entre les carottes
- Marges

Même s'il est possible d'introduire jusqu'à 1000 carottes dans un bloc de 40x25 mm, la construction des blocs comportant plus de 500 carottes nécessite une minutie difficile à atteindre. De plus, d'après notre expérience, les blocs contenant

une trop grande densité de carottes ont tendance à se briser au moment de leur coupe au microtome.

C'est pourquoi nous avons privilégié dans notre étude des micromatrices comportant une centaine de carottes tout au plus.

La perte tissulaire survenant lors de la coupe ou du transfert sur des lames chargées représente un autre des inconvénients majeurs des MMT. D'après la littérature, ces pertes atteignent régulièrement de l'ordre de 10 à 30% du total de carottes. La longueur et la qualité des carottes permettent cependant de diminuer les pertes tissulaires, par exemple, il est important d'éviter de grandes variations de hauteur des carottes.

Des analyses immunohistochimiques ont déjà été menées pour déterminer le nombre de carottes nécessaire pour bien représenter différents tissus. Un bon taux de concordance est obtenu lorsque trois carottes sont incluses, y compris pour des marqueurs de répartition hétérogène comme le Ki67. Pour certains marqueurs comme le HER2 ou les récepteurs hormonaux, différentes études ont validé l'utilisation de deux ou parfois même d'une seule carotte par spécimen [79, 80].

Pour notre étude, nous avons étudié chaque tumeur à l'aide de 3 carottes tumorales provenant d'un ou deux blocs tumoraux. Selon notre hypothèse de recherche, le phénotype basal d'une tumeur du sein pourrait n'être conféré que par une minorité de cellules tumorales suffisamment agressives pour déterminer le comportement de la tumeur et nécessiter une prise en charge particulière pour le

patient. Il nous semblait donc indiqué d'échantillonner suffisamment chaque tumeur pour augmenter la sensibilité de détection de ces sous-groupes cellulaires potentiels.

L'appareil MTA-1 permet de réaliser des carottes comportant plusieurs diamètres allant de 0.6 à 2mm. Plus le diamètre de carottage est petit, plus le nombre total de carottes qui peuvent être incluses dans le MMT est grand. D'autre part, plus le diamètre de la carotte est grand, plus la zone de la tumeur représentée est importante. La plupart des études qui ont validé l'usage des MMT dans le cancer du sein ont utilisé des carottes de 0.6mm ou de 1mm. Nous avons choisi un diamètre d'un mm par carotte pour la confection des blocs.

L'orientation et l'ordre d'inclusion des cas sont particulièrement cruciaux, l'utilisation de repères d'architecture ou de tissus de contrôle permettant un repérage et une orientation plus facile du sens de lecture. Il ne faut pas oublier de possibles effets de rehaussement lors de l'inclusion des carottes, c'est-à-dire des artéfacts de coloration qui peuvent survenir aux bords des tissus, ceux-ci retenant davantage certains chromogènes. Nous avons donc pris en compte tous ces éléments lors de la confection de nos MMT.

2.4 Fabrication de la MMT

Une fois que le plan de la MMT a été établi et que le bloc de paraffine receveur et les blocs donneurs sont prêts, la construction de la MMT peut débuter.

Le bloc de paraffine vierge receveur est donc placé et fixé dans son réceptacle. Le premier forage dans la première position de la matrice est confectionné à l'aide du premier poinçon (qui est un peu plus petit que le second). Le premier bloc donneur est placé dans le pont pour prélever la première carotte avec le deuxième poinçon, qui est alors placée dans la cavité réalisée dans le bloc de paraffine vierge. Pour la confection du deuxième forage et l'insertion de la deuxième carotte, l'axe contenant les poinçons est avancé de 1mm dans le plan horizontal. (Pour changer de rangée de carottes l'axe est avancé à la verticale). On répète cette opération successivement avec chacun des blocs donneurs jusqu'à complétion de toutes les rangées de carottes tumorales.

Une fois confectionné, il convient de placer le bloc MMT dans une chambre chaude (37°) pendant 10 à 15 minutes avant de le couper au microtome. Ceci permet de réchauffer la paraffine et de promouvoir l'adhérence des carottes tissulaires au bloc.

V.2 Réalisation de notre MMT

1. Sélection des blocs donneurs

Après une analyse histologique de toutes les lames HPS correspondant à tous les blocs tumoraux de chaque patiente, nous avons sélectionné un à deux blocs par patiente pour la construction de la MMT. Les blocs que nous avons retenus possèdent les critères suivants:

- Haute densité et surface tumorale.

- Zone tumorale de plus haut grade et à caractère invasif dans les cas de tumeurs hétérogènes.
- Bloc le plus épais.

2. Disposition de tumeurs dans le MMT:

Nous avons fabriqué trois micromatrices tissulaires (appelés MMT 2.1, MMT2.2 et MMT 2.3) pour échantillonner soixante-quatre cas des soixante-huit cas de la deuxième cohorte (21 à 22 cas par MMT). Quatre cas ont été exclus de la cohorte initiale par manque de blocs tumoraux adéquats pour la construction de la micromatrice. Les cas 4, 10, 26 et 63 ne sont donc pas représentés. Pour contourner les principales faiblesses du MMT (hétérogénéité des spécimens et perte des carottes), nous avons décidé de prélever trois carottes de un mm de diamètre par tumeur.

Nous avons également décidé de placer chaque carotte tumorale provenant d'un même spécimen dans une "sub-micromatrice" (c'est à dire, un groupe de carottes provenant de tumeurs différentes) complémentaire au sein d'un même bloc de MMT. Chaque MMT est donc composé de 3 "sub-micromatrices" tumorales (A, B, D) complémentaires, chaque "sub-micromatrice" comportant une carotte de chaque tumeur représenté dans le bloc de MMT. La disposition des carottes dans toutes les "sub-micromatrices" d'une même MMT est conservée. (Voir figure 2)

Chacune des trois blocs de MMT est représentatif de toute la cohorte, c'est-à-dire, les différents types de tumeurs sont repartis uniformément (de par leur grade, leur

statut hormonal et leur statut HER2) dans chaque bloc de MMT. Chacun des blocs de MMT 2.1, 2.2, 2.3 comportent:

- 12-13 cas de carcinomes de grade III -/-/-
- 4 cas de carcinomes de grade III -/-/+
- 2 à 3 cas de carcinomes de grade III +/-/-
- 1 à 2 cas de carcinomes de grade III +/+/+ ou -/+/+
- 1 à 2 cas de carcinome de grade I ou II

Disposition des tissus de contrôle:

13 tissus contrôles (sein normal (4), carcinome mammaire (2), prostate (1), utérus (1), placenta (1), amygdale (1), intestin (1), peau (1), rein (1) ont été représentés par une carotte par tissu dans une 4^{ème} "sub-micromatrice (submicromatrice D) dans chaque MMT.

Les carottes, et donc les "sub-micromatrices", ont été placées au centre du bloc de paraffine, les marges du bloc étant plus fragiles et susceptibles aux fissures.

Au total, nous avons donc confectionné 3 blocs de MMT, chacun comprenant entre 63 et 66 carottes tumorales et 13 carottes de tissu de contrôle (76 à 79 carottes au total par MMT)

La disposition des sub-micromatrices au sein du MMT a été configurée pour permettre, d'une part, un repérage facile des carottes, et d'autre part, pour éviter l'effet de "zoning": les carottes situées en périphérie de la matrice dans une "sub-

micromatrice" se trouvent donc au centre de la matrice dans une autre" sub-micromatrice", et vice-versa.

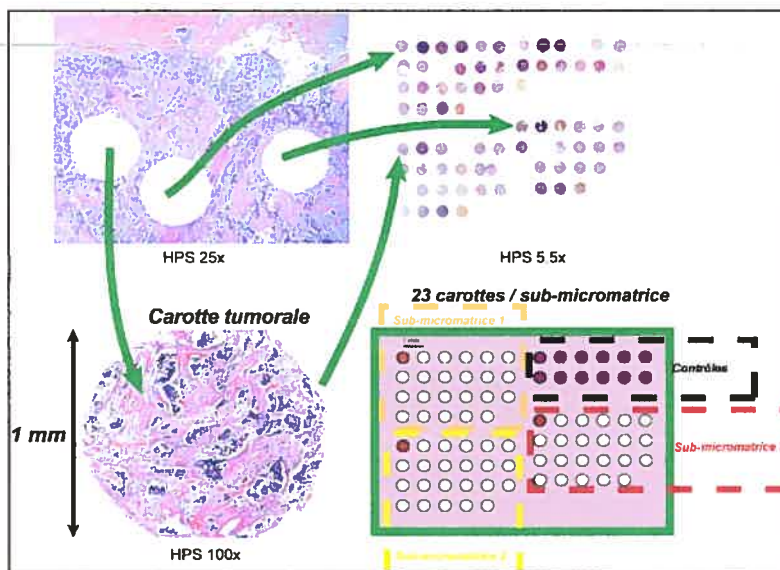


Figure 2: Fabrication de la MMT

Légende: A. Section tumorale colorée à l' HPS à 25x après prélèvement des carottes tumorales. B. Photographie à 5.5x d'une section d'un bloc de MMT. C. Photographie à 100x d'une carotte tumorale de la MMT. D. Schéma du bloc de MMT, indiquant la subdivision en sub-micromatrices et la disposition des tissus de contrôle. Les flèches vertes indiquent la localisation des trois carottes provenant d'une même tumeur au sein de la MMT.

3. Obtention des lames à partir du MMT

A partir du bloc de MMT, nous avons réalisé des coupes à 3μ au microtome.

Environ une cinquantaine des lames ont été réalisées par MMT. En raison de l'épaisseur variable des blocs tumoraux, toutes les carottes incluses dans le MMT n'ont pas la même épaisseur. Les tumeurs les moins épaisses, avec des carottes les plus courtes, ne sont pas représentées dans les premières et /ou les dernières lames de la MMT. Ce sont les lames provenant du milieu de chaque bloc de la MMT qui comportent le plus grand nombre de carottes tumorales représentées, qui ont été

utilisées pour le marquage en IHC. Par ailleurs, à cause des phénomènes électrostatiques lors de la confection des coupes au microtome, certaines carottes se sont décollées du bloc de paraffine avant d'être reposées dans la lame. Nous avons tout de même obtenu suffisamment de lames avec un minimum de deux carottes par patiente pour l'étude en IHC. Environ, deux tiers des tumeurs ont été représentés à la MMT par trois carottes, un tiers des tumeurs par deux carottes, et dans un seul cas (patiente 37) par une seule carotte (1.5% des cas).

Parmi les lames réalisées pour le FISH HER2, les trois carottes du cas 29 sont absentes dans la lame du MMT 2.3, l'information pour cette patiente quant à son statut HER2 en FISH n'est donc pas disponible.

Pour chaque bloc de MMT, nous avons réalisé une lame colorée en HPS pour confirmer l'identité tumorale des carottes. Excepté pour trois cas (cas 7, 22 et 48), le prélèvement pour l'ensemble des carcinomes s'est déroulé de façon optimale au sein de la zone d'invasion tumorale.

En conclusion, de nos 68 patientes initiales, 64 ont été incluses dans la MMT. Les cas 4, 10, 26 et 63 ne sont pas représentés.

Comme les carottes des tumeurs 7 et 22 ont été prélevées dans du tissu adipo-stromal, nous n'avons pas d'information concluante ni en IHC ni en FISH pour les tumeurs de ces patientes. Pour la patiente 48, nous n'avons qu'une carotte prélevée en partie au sein de la tumeur (10% de la carotte étant du tissu tumoral). Ce matériel nous a semblé insuffisant pour l'étude en IHC, mais adéquat pour l'évaluation du résultat en FISH.

Pour les 61 patientes restantes, nous avons au moins deux carottes par patiente prélevées au sein de la tumeur, conservées lors de la coupe au microtome (sauf dans la lame utilisée pour le FISH HER2, ou les trois carottes de la patiente 29 ont décollées), et pour lesquelles nous avons des résultats en IHC et FISH.

V.3 Caractérisation tumorale par IHC sur MMT

1. Sélection des antigènes cibles

Nous avons sélectionné (voir tableau III):

- 1- Des marqueurs reconnus dans la littérature comme des marqueurs de phénotype basal d'après des études par profil génétique validés en IHC.
- 2- Des marqueurs validés dans notre laboratoire comme des marqueurs des cellules myoépithéliales/basales du sein normal (rfs Thèse du Dr Jolicoeur).
- 3- Des marqueurs reconnus dans la littérature et dans notre laboratoire comme des marqueurs de cellules luminales.
- 4- Même si nous avons à notre disposition les données en IHC réalisée au CHUM pour les récepteurs à œstrogène et progestérone en IHC, nous avons répété ces marquages nous mêmes.

Tableau III. Description des Antigènes cibles (première partie)

Nom	Description	Type de marquage	Tissu pour contrôle positif
ER (Récepteurs oestrogéniques)	Récepteur stéroïdien nucléaire. CL	Nucléaire CL	Sein normal
PR (Récepteurs progestérone)	Récepteur stéroïdien nucléaire. CL	Nucléaire CL	Sein normal
EGFR/ HER-1 (Récepteur du facteur de croissance épithéliale 1)	Récepteur membranaire des tyrosines Kinases	Membranaire CB	Peau
CK5RTU et CK5/6 (Cytokératine 5)	Kératine de 58 KD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des filaments intermédiaires. Jugée typique des CL.	Membranaire, cytosolique CB,CP	Prostate
CK19 (Cytokératine 19)	Kératine de type I (acide) de 40 KD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des filaments intermédiaires. Jugée typique des CL.	Membranaire, cytosolique CL	Amygdale
CK17 (Cytokératine 17)	Kératine de type I (acide) de 46 KD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des filaments intermédiaires. Jugée typique des CB.	Membranaire, cytosolique CB	Prostate

Légende: CL (cellule Luminale), CB (cellule basale), CP (cellule progénitrice), FB (fibroblaste), MFB (myofibroblaste).

Tableau III. Description des Antigènes cibles (deuxième partie)

Nom	Description	Type de marquage	Tissu pour contrôle positif
CK14 (Cytokératine 14)	Kératine de type I (acide) de 50 KD (bas poids moléculaire). Composante cytosquelettique du réseau des filaments intermédiaires. Jugée typique des CB.	Membranaire, cytosolique CB	Peau
EMA (Angl. Epithelial membrane antigen)	Marqueur associé à la sécrétion, il marque donc les cellules luminales sécrétrices.	Membranaire CL	Rein
SMA (actine du muscle lisse)	Composante cytosquelettique principale du réseau actinien.	Cytosolique CB, FB,MFB	Intestin, Utérus

Légende: CL (cellule Luminale), CB (cellule basale), CP (cellule progénitrice), FB (fibroblaste), MFB (myofibroblaste).

2. Immunohistochimie avec appareil automatisé sur MMT

Pour la coloration immunohistochimique automatisé nous avons utilisé l'appareil automatique de Ventana Discovery XT (Tucson, Arizona). Nous avons ciblé les marqueurs figurent au tableau IV.

Pour chaque réaction d'IHC des contrôles négatifs sont réalisés en appliquant le même protocole sans ajouter l'anticorps primaire.

Tableau IV: Marqueurs ciblés en IHC pour la cohorte "finale".

Cibles	Clone	Type	Fabriquant	Dilution	Détail
ER	1D5	So IgG	Dakocytomation	1:10	P,CC1,noH,DAB
PR	PgR636	So IgG1	Dakocytomation	1:10	P,CC1,noH,DAB
EGFR (HER-1)	31G7	So IgG1	Zymed	1:75	P,4P1,H,DAB
CK5RTU	XM26	So IgG1	Novocastra	pas de dilution	P,CC2,H,DAB
CK5/6	D5/16B4	So IgG1	Dakocytomation	1:40	P,CC1,H,DAB
CK19	RCK108	So IgG1	Dakocytomation	1:50	P,4P1,H,DAB
CK17	E3	SoIgG2a	Dakocytomation	1:10	P,CC1,H,DAB
CK14	LL002	SoIgG3	Novocastra	1:10	P,CC2,H,DAB
EMA	E29	SoIgG2a	Dakocytomation	1:600	P,CC2,H,DAB
SMA	1A4	SoIgG2a	Dakocytomation	1:400	P-NO-H, DAB

Légende du tableau IV: **P** (déparaffinage), **NO** (sans pré-traitement au tampon), **CC1** (pré-traitement au tampon CC1), **CC2** (pré-traitement au tampon CC2), **H** (pré-traitement à la chaleur), **DAB** (contre-coloration au DAB).

Des lames provenant de coupes sériées ont été utilisées pour le marquage en IHC.

Ceci nous a permis de comparer les marquages au sein de structures tumorales superposables.

Nous avons suivi l'ordre des marqueurs suivants:

1. EGFR (HER-1)
2. ER
3. PR
4. CK5RTU
5. CK5/6
6. CK19
7. CK17
8. CK14
9. EMA
10. SMA

Nous avons superposé des marqueurs d'origine luminal et de marqueurs d'origine basale dans l'ordre des marqueurs utilisés, ceci dans le but de comparer l'identité des cellules exprimant les deux types de marqueurs.

Pour certains marquages, des lames supplémentaires issues d'autres niveaux de coupe du MMT ont été aussi utilisées.

3. Évaluation des résultats

Pour rappel, toute tumeur ayant au moins 1% des cellules tumorales marquant pour un des marqueurs basaux a été considérée positive pour ce marqueur. En effet, le but de cette étude est d'identifier tous les carcinomes ayant une composante cellulaire avec des caractéristiques basales, que cette composante cellulaire soit majoritaire au sein de la tumeur ou non. Selon notre hypothèse de recherche, des groupes minoritaires de cellules cancéreuses ayant des

caractéristiques basales pourraient suffire pour déterminer le comportement global de la tumeur, c'est à dire la résistance aux traitements, l'invasivité et le pouvoir de métastase. (Voir introduction et discussion). Le système d'évaluation de résultats, notamment vis à vis des nos études statistiques, est un système binaire (positif ou négatif), distinguant les tumeurs avec ou sans composante basale.

Dans le même ordre d'idées, il nous a semblé pertinent d'identifier les tumeurs n'exprimant pas les marqueurs des cellules luminales, ou composées en partie, de groupes cellulaires silencieuses pour ces marqueurs, laissant présager une origine/différenciation vers un autre type cellulaire. Par ailleurs, la comparaison de deux types de marquage (basal et luminal) au sein de mêmes zones tumorales, nous a fourni des informations intéressantes quant à l'origine possible des cellules cancéreuses possédant des caractéristiques basales.

Le système d'évaluation de résultats des marqueurs luminaux est un système ternaire (0= aucune expression du marqueur luminal au sein de cellules cancéreuses; 1= moins de 50% de la tumeur exprimant le marqueur; 2= plus de 50% de la tumeur exprimant le marqueur).

Le système d'évaluation est résumé au le tableau V.

Tableau V: Évaluation des résultats

Antigène	Résultats sur lame standard	Résultats sur MMT
ER	Non applicable	- = < à 10% de cellules positives + = > à 10% de cellules positives
PR	Non applicable	- = < à 10% de cellules positives + = > à 10% de cellules positives
EGFR	Non applicable	Quantification automatique par le système d'analyse VIAS (Ventana Image Analysis System)
CK5RTU	Non applicable	0= pas de marquage 1= >1% de cellules tumorales positives dans au moins une des carottes
CK5/6	Non applicable	0= pas de marquage 1= > 1% de cellules tumorales positives dans au moins une des carottes
CK19	Non applicable	0= pas de marquage 1= marquage < 50% de la tumeur ou faible intensité 2=marquage > 50% de la tumeur et forte intensité
CK14 CK17	0= pas de marquage 1= >1% de cellules tumorales positives	0= pas de marquage 1= > 1% de cellules tumorales positives dans au moins une des carottes
EMA	Non applicable	0= pas de marquage 1= marquage < 50% de la tumeur ou faible intensité 2=marquage > 50% de la tumeur et forte intensité
aSMA	0= pas de marquage 1= >1% de cellules tumorales positives	0= pas de marquage 1= 1% de cellules tumorales positives dans au moins une des carottes.

V.4 Caractérisation tumorale par FISH sur MMT

1. Définition

Le FISH ("Fluorescent In Situ Hybridization") est une technique moléculaire d'hybridation permettant de détecter des séquences spécifiques d'ADN sur des noyaux inter/meta-phasiques fixés à une lame de microscope. La sonde s'appariant à l'ADN cible complémentaire est préalablement marquée par l'incorporation d'un nucléotide rapporteur modifié chimiquement. Ce nucléotide est lié de façon covalente à un fluorochrome.

Nous avons utilisé cette technique pour détecter, de façon très sensible, des tumeurs contenant une amplification de l'oncogène **HER2**, et des tumeurs ayant une amplification du gène de la topoisomérase 2A.

Généralités de la technique:

- Obtention et conservation de la sonde: il existe plusieurs procédés pour obtenir une sonde: microdissection manuelle de chromosomes et micro-clonage, clonage d'ADN dans un vecteur, synthèse d'ADN in vitro. L'ADN obtenu est marqué pour pouvoir être détecté. Le marquage peut se faire avec des nucléotides modifiés à la biotine ou la digoxigénine, ils peuvent également être directement marqués par un fluorochrome. Les sondes sont préservées dans une solution d'hybridation (tampon d'hybridation) favorisant l'hybridation moléculaire spécifique de la sonde avec la séquence ciblée.

- Dénaturation de la sonde à la chaleur.
- Pré hybridation: Incubation de la sonde sur la lame histologique dans son tampon d'hybridation. Cette étape permet l'hybridation des séquences répétées avec l'ADN de sperme de saumon; elle contribue à diminuer le bruit de fond.
- Les spécimens sont préparés pour l'hybridation, d'abord par une digestion enzymatique des protéines, puis par une dénaturation de l'ADN à la chaleur. Après l'hybridation, des lavages sont effectués pour éliminer les hybridations non spécifiques et instables.

2. FISH HER2 sur lames MMT

Nous avons utilisé la trousse commerciale Path Vision (Vysis), utilisé pour le diagnostic en clinique. (Approuvé par le FDA). Nous avons respecté le protocole ayant cours au département de pathologie de l'Hôpital Hôtel Dieu en pratique clinique, et l'avons adapté et optimisé pour nos lames de MMT.

Cette trousse permet la détection de l'amplification du gène HER2 par FISH dans des spécimens de cancer du sein enrobés en paraffine.

La trousse comporte un mélange de 2 sondes d'ADN. La sonde LSI®, qui reconnaît la totalité du gène HER2, est couplée au fluorochrome SpectrumOrange. La sonde CEP17® reconnaît l'ADN centromérique alpha satellite du centromère du chromosome 17 (17p11.1_q11.1); elle est couplée au fluorochrome vert SpectrumGreen. La double hybridation des deux signaux permet de calculer un ratio entre les copies du gène HER2 et le nombre de centromères, permettant ainsi

de différencier les amplifications/délétions du gène HER2 des polysomies/aneuploïdies du chromosome 17. Le gène HER2 est considéré amplifié lorsque le ratio HER2/centromère 17 est supérieur à 2.

Protocole :

Nous avons utilisé un incubateur de lames "microprobe" faisant appel au phénomène de distribution des réactifs par capillarité.

1. Déparaffinage

Incubation des lames pendant 15 minutes à 70°C (Incubateur Microprobe)

Immersion des lames 2x2 minutes dans du Xylène/hémode à 70°C.

Immersion des lames 2x2 minutes dans du Xylène/hémode à 20°C.

Immersion des lames dans de l'éthanol 100%, répéter 4 fois.

Immersion des lames dans de l'éthanol 95%, répéter 4 fois.

2. Pré-traitement

20 minutes à 80°C dans une solution de 1N NaSCN

Lavage à l'eau (3X) et au tampon Wash Buffer (SSC)

3. Digestion enzymatique

Ajout de 50µl de protéinase K (10mg/ml) dans 1 ml de tampon d'extraction (5ml

Tris 1M, pH7.5, 200ul de 0.5 EDTA, 500ul de Tween)

Digestion pendant 7minutes à 37°C.

Lavages au Wash Buffer (3x)

4. Déshydratation

2x70% éthanol

2x 95% éthanol

2x 100% éthanol

5. Codénaturation et Hybridation (Dénaturation de la sonde par la chaleur)

- Application de 20 à 30 µl de la sonde pour couvrir au moins deux sub-micromatrices de la MMT, élévation de la température à 92°C dans un bloc chauffant pendant 8 minutes.

Incubation dans une chambre humide à 37°C pendant 18h.

NB: Bien sûr, toutes les étapes qui précèdent le dévoilement du signal doivent être effectuées à la pénombre, afin de ne pas affaiblir le signal fluorescent.

6. Lavages

Dans une solution de 1.5 SSCpH7-7.5 0.3% NP40 4minutes à 68°C

Séchage des lames. Ensuite, les spécimens sont montés dans un milieu fluorescent contenant du DAPI (environ 15µl), qui colore les noyaux cellulaires en bleu.

7. Lecture des lames

Après refroidissement à -21°C, la lecture se fait à l'aide d'un microscope à fluorescence. NB: Le stockage des lames à 4°C permet une conservation de la fluorescence pendant plusieurs semaines.

3. FISH TOP2A sur les lames du MMT

La trousse TOP2A FISH pharm Dx, une trousse commerciale pour les spécimens enrobés en paraffine, a été utilisée. Cette trousse comporte un mélange d'ADN de cosmide (230kb) complémentaire au gène TOP2A couplé au fluorochrome Texas

Red ainsi que de l'ADN ciblant le centromère du chromosome 17 et couplé à la fluorescéine. L'hybridation spécifique des deux cibles résulte en deux signaux indépendants et distincts : un signal vert pour le centromère et un signal rouge pour la topoisomérase. Pour diminuer le bruit de fond, le mélange contient aussi de l'ADN non spécifique. Le protocole accompagnant la trousse a été adapté à notre usage pour les lames de MMT.

La technique comporte les étapes suivantes :

1. Déparaffinage et réhydratation des tissus à température ambiante.

Même protocole que pour le FISH HER2.

2. Pré-traitement :

- a. Incubation des lames dans un contenant rempli de la solution de pré-traitement (fournie avec la trousse) dans un bain chauffant à 95-99°C pendant 10 minutes.
- b. Refroidissement des lames dans la solution de pré-traitement pendant 15 minutes à température ambiante.
- c. Incubation des lames dans un contenant rempli de la solution Wash Buffer (fournie avec la trousse), 2 x 3 minutes.

3. Digestion enzymatique :

- a. Application de 5-10 gouttes pour recouvrir la lame (environ 250µl) de pepsine froide (2-8 minutes) (fournie avec la trousse).
- b. Incubation pendant 5 à 15 minutes à température de la pièce. (Nous avons essayé deux temps d'incubation pour nos expériences : 10 minutes et 17 minutes.)
- c. Rinçage et incubation des lames 2x3 minutes dans du tampon de lavage.

d. Déshydratation des lames (2 minutes dans de l'éthanol 70%, suivi de 2 minutes dans de l'éthanol 85%, et de 2 minutes dans de l'éthanol 100%)

4. Dénaturation et Hybridation :

a. Application de la sonde. Environ de 20 à 30 µl sont nécessaires pour recouvrir les lames du MMT en entier. Recouvrement par une lamelle fixée par le milieu de montage « Coverslip sealant », fourni avec la trousse.

b. Dénaturation de l'ADN sur une plaque chauffante à 82 °C pendant 5 minutes.

b. Incubation avec les sondes dans une chambre humide à 45 °C pendant 14 à 20h.

5. Lavages

a. Décollement de la lamelle.

b. Rinçage des lames dans la solution Strigent Wash Buffer (fournie avec la trousse) dans un bain- marie chauffé à 65°C.

c. Lavage des lames dans le tampon de lavage, 2x3 minutes.

d. Déshydratation.

6. Montage des lames

Application d'une colle DAPI (environ 20µl) et d'une lamelle.

7. Lecture des lames au microscope à fluorescence.

VI. ANALYSE STATISTIQUE

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le programme informatique SAS 9.0, en collaboration avec l'équipe des biostatisticiens du CHUM, sous la direction du Dr Abrahamowicz.

Nous avons utilisé les tests Pearson chi-square et Fisher's Exact test.

RÉSULTATS

I. COHORTE PRELIMINAIRE: RÉSULTATS PRELIMINAIRES

I.1 Composition de la cohorte

La composition de cette cohorte figure au tableau VI.

I.2 Identification des cancers basaux

Les carcinomes basaux ont été recherchés par l'expression en IHC de trois marqueurs des cellules basales/myoépithéliales par les cellules cancéreuses.

Les résultats sont résumés au tableau VI.

Au total, nous avons identifié dix-sept carcinomes mammaires positifs pour au moins un des marqueurs basaux parmi les 64 cas étudiés. Ceci représente 26% des tumeurs de notre première cohorte. Il s'agit, pour tous les cas, de tumeurs de type histologique canalaire.

Parmi les vingt-trois tumeurs de bas grade, nous avons trouvé deux cas avec un immunophénotype basal. Ces deux cas affichent un marquage positif à la CK17 mais non à l'aSMA ni à la CK14. Aucun de deux cas n'exprime les récepteurs

d'œstrogène, ni ne sur-exprime le gène HER-2. Un cas exprime les récepteurs de progestérone, l'autre pas.

Parmi les 51 tumeurs de haut grade, quinze tumeurs ayant un immunophénotype basal ont été identifiées. Onze tumeurs expriment la CK17, neuf l'aSMA, et trois tumeurs la CK14. Deux de ces quinze tumeurs ont un statut de récepteurs hormonaux et de HER-2 inconnu d'après les dossiers du CHUM. Parmi les autres treize cas restants, douze (92%) ont un phénotype "triple négatif", c'est à dire, qu'ils n'expriment ni les récepteurs hormonaux à œstrogène, ni à la progestérone, ni d'amplification du gène d'HER-2.

Parmi les 17 tumeurs de phénotype basal, une de ces tumeurs a montré une sur-expression de l'oncogène HER-2 en IHC. D'autre part, des quinze tumeurs avec sur-expression du gène HER-2, un seul cas a un phénotype basal en IHC, ce qui représente 6% des tumeurs avec sur-expression de HER-2.

En résumé:

- 26% des tous les tumeurs de notre première cohorte ont un immunophénotype basal.
- 100% des cas sont des carcinomes canalaux.
- 88% des carcinomes basaux sont de haut grade.
- 86% n'expriment ni les récepteurs à œstrogène, ni à la progestérone, et ne sur-expriment pas le gène HER-2. Par ailleurs, 60% des tumeurs de haut grade avec le phénotype "triple négatif", ont un immunophénotype basal.

- Aucune tumeur exprimant les récepteurs d'œstrogène n'a exprimé un des nos marqueurs basaux.
- Nous avons identifié un cas de carcinome basal sur-exprimant l'oncogène HER-2 (ce qui représente 7% des carcinomes basaux), et un cas exprimant des récepteurs à la progestérone (7% des carcinomes basaux.)

A partir de ces résultats, nous avons constitué la deuxième cohorte (cohorte "finale"), composée de carcinomes canaux et médullaires uniquement, majoritairement de haut grade, n'exprimant pas les récepteurs hormonaux ni de sur-expression de HER-2. Nous avons par ailleurs aussi inclus des carcinomes canaux sur-exprimant l'oncogène HER 2, et quelques carcinomes exprimant les récepteurs à la progestérone. Les carcinomes de bas grade et/ou exprimant des récepteurs d'œstrogène constituent une minorité des cas étudiés.

Tableau VI: Récapitulation des résultats de la cohorte préliminaire

	n	Grade Tumoral (SBR)	ER/PR/HER-2	Histologie	Tumeurs positives pour marqueurs basaux en IHC
	3	Bas grade	+/+/+	canalaire	0
	2	Bas grade	-/-/-	lobulaire(1) canalaire(1)	1(CK17+) (canalaire)
	11	Bas grade	+/+/-	tubulaire(2) canalaire(9)	0
	1	Bas grade	+/-/-	canalaire	0
	1	Bas grade	-+/-	canalaire	1 (CK17)
	2	Bas grade	-/-/+	canalaire	0
	3	Bas grade	inconnu	canalaire	0
Total	23				2 (CK17+)
	2	Haut grade	+/+/+	canalaire	0
	20	Haut grade	-/-/-	canalaire	12 7(aSMA+ et CK17+) 1(aSMA+) 3 (CK17+) 1(CK14+)
	12	Haut grade	+/+/-	canalaire	0
	3	Haut grade	+/-/-	canalaire	0
	8	Haut grade	-/-/+	canalaire	1 (CK17+)
	6	Haut grade	inconnu	canalaire	2 1 (CK14) 1 (CK14+ et aSMA+)
Total	51				15/51

Légende du tableau VI: Les tumeurs ont été classées selon leur grade, leur statut hormonal et le statut du gène HER-2 déterminé par les cliniciens au CHUM. **n**: nombre de spécimens; **Bas grade**: grades SBR I et II/III, **Haut grade**: grades SBR III/III; **ER/PR/HER-2**: résultats en IHC réalisée par cliniciens au CHUM. -: négatif pour le marqueur, pas de surexpression de HER-2, +: positif pour le marqueur, surexpression de HER-2; **tumeurs positives pour marqueurs basaux**: le nombre de spécimens est indiqué suivi, entre parenthèses, du /des marqueurs positifs.

I.3 Données morphologiques et cliniques des cancers basaux de la cohorte préliminaire

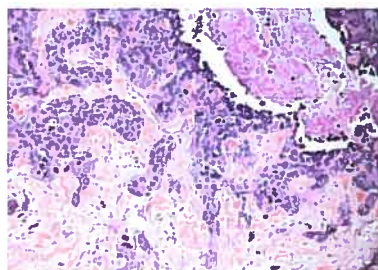
En excluant les cas pour les quels nous n'avons pas réussi à retracer suffisamment d'information, et les cas des patientes ayant refusé la suite du traitement (après la chirurgie), nous avons pu étudier l'évolution clinique de sept femmes parmi les dix-sept cas de carcinomes mammaires de phénotype basal identifiés dans la première cohorte.

L'évolution clinique a été différente d'un cas à l'autre. Les cas 24 et 35 ont évolué de façon fulminante. Les patientes n'ont pas répondu au traitement par radiothérapie et chimiothérapie, avec apparition des métastases pulmonaires et osseuses, elles sont décédées dans l'année suivant le diagnostic. Ces tumeurs sont illustrées aux figures 3 et 4.

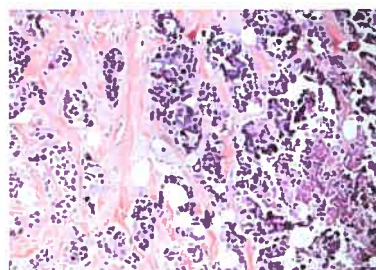
Le reste des cas étudiés (cinq cas) ont répondu au traitement avec une évolution favorable jusqu'à présent. Tout de même, les patientes ne sont qu'à leur deuxième ou troisième année de suivi post diagnostic. (Voir par exemple cas 72 à la figure 4)

Les principales caractéristiques histologiques des tumeurs à phénotype basal dans cette cohorte sont les suivantes : importance de la réaction stromale, infiltrat inflammatoire marqué, et nécrose étendue.

I.4 Figures



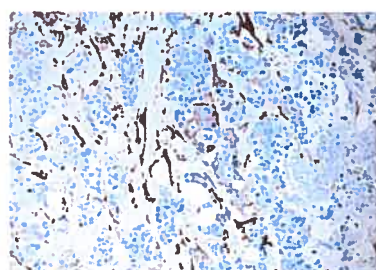
A- cas 35, HPS



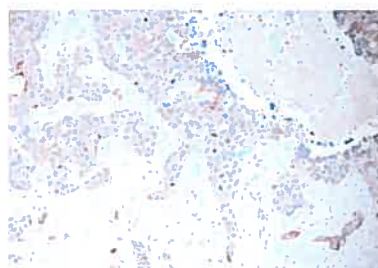
D- cas 35, HPS



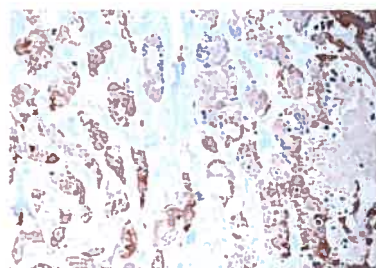
B- cas 35, aSMA



E- cas 35, aSMA



C- cas 35, CK17

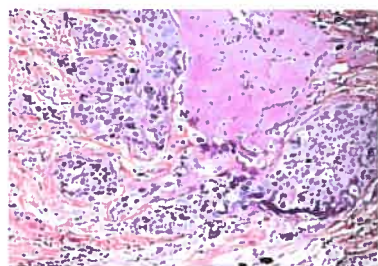


F- cas 35, CK17

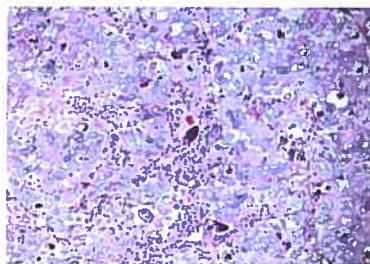
Figure 3: Résultats en IHC, cas 35 1^{ère} cohorte.

Légende : **A.** Tumeur 35 de la cohorte 1, coloration HPS sur foyer 1, 200x. **B.** Tumeur 35 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-aSMA sur foyer 1, 200x. **C.** Tumeur 35 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-CK17 sur foyer 1, 200x. **D.** Tumeur 35 de la cohorte 1, coloration HPS sur foyer 2, 200x. **E.** Tumeur 35 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-aSMA sur foyer 2, 200x. **F.** Tumeur 35 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-CK17 sur foyer 2, 200x.

La patiente est décédée de la maladie un an après le diagnostic.



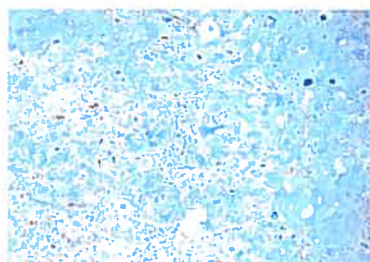
A- cas 24, HPS



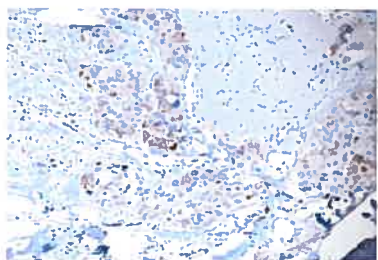
D- cas 72, HPS



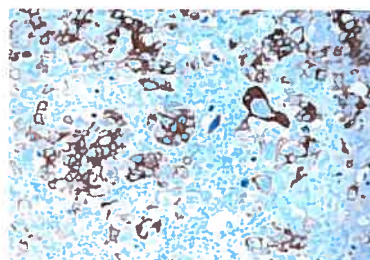
B- cas 24, aSMA



E- cas 72, aSMA



C- cas 24, CK17



F- cas 72, CK17

Figure 4: Cas 24 et 72 de la 1^{ère} cohorte.

Légende: **A.** Tumeur 24 de la cohorte 1, coloration HPS, 200x. **B.** Tumeur 24 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-aSMA, 200x **C.** Tumeur 24 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-CK17, 200x. La patiente est décédée de la maladie un an après le diagnostic.

D. Tumeur 72 de la cohorte 1, coloration HPS 200x. **E.** Tumeur 72 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-aSMA, 200x. **F.** Tumeur 35 de la cohorte 1, IHC avec l'anti-CK17, 200x. Bonne évolution de la patiente, 3 ans de suivi.

II. RÉSULTATS DE LA COHORTE FINALE

II.1 Analyse pathologique

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (première partie)

Patient	Age	SRB N°411	ERPR	D	Exy	CIS	Enlèvement	Description	Note	Autres pathologies remarquées	Bios
1	46	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Non	/	3x2,2cm. Cellules tumorales en amas, nécrose centrale, peu de stroma intra-tumoral.	GLN 0/4	Modifications fibrokystiques.	A8, A9, A10
2	57	III/III (3,3,2)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Comedonien cribiforme III/III, 10%	Lymphatique	4x4x3cm. Stroma peritumoral fibreux, petite zone centrale acellulaire, un peu de nécrose. Pas visible infiltrat inflammatoire.	T2N0Mx GLN 0/11	Fibroadénome sclérokystiques adénose sclérosante.	D8, D9, D10.
3	59	III/III (3,3,3)	-/-	-	Mucillaire	Solide, II/III 1 foyer	/	1cm. Syncytium de cellules tumorales, infiltrat lymphoplasmocytaire, abondants foyers de nécrose.	T1N0Mx GLN 0/4	/	B6.
4	44	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme solide II/III	Lymphatique	4x3,5x3,5. Cellules tumorales en cordons et en amas. Stroma fibreux, inflammatoire, plaques d'apoptose. Zoues de métaplasie malpighienne.	T2N2Mx GLN 4/15	Modifications sclérokystiques.	A9, A11, A12
5	72	III/III (3,2,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant Bifocal	Cribiforme, comedonien II/III, 5%	Lymphatique et perineural	2,5x1,5x1,5 et 3,3x2,2x2. Oncocyttaire. Infiltrat lymphocytaire, réaction inflammatoire avec centres germinatifs	T3N1Mx GLN 2/12	/	A9
6	60	III/III (2,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, 10%	Lymphatique	2x1,8x1,7. Tumeur dense avec plage centrale peu cellulaire. Peu de stroma, amas cellulaires séparés par quelques fibres conjonctives.	T1NxMx GLN 0/4	/	C8, C9,
7	44	III/III (3,2,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	/	0,8x0,7x0,7. Petite tumeur, cellules en amas, pseudopapilles, plage nécrotique centrale, infiltrat inflammatoire.	T1NxMx	Modifications Sclérokystiques, cicatrice fibreuse.	A1, A2
8	55	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	Lymphatique	7x8x8,5cm. Peu différencié et polymorphe, beaucoup de cellules individuelles, beaucoup de plaques de nécrose, nécrose centrale, quelques cellules géantes, multinucléées. Peu de stroma. Par centres tumeur mieux différenciés.	T3N1Mx GLN 3/19	/	A11, A13, A16
9	60	III/III (2,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, comedonien 50%	Lymphatique	1,4x1,3x1,3. Plage nécrotique centrale, inflammation.	T1N1Mx GLN 2/6	Modifications sclérokystiques, hyperplasie simple, microcalcifications, stononécrose, métaplasie apocrine.	B12
10	41	III/III (3,2,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, papillaire, comedonien 50%	/	1,5x1x1. Peu différencié, cellules en cordons et amas, inflammation autour tissu normal et tumeur. Fins traversées collagène.	T1N2Mx GLN 9/14	Modifications sclérokystiques.	A9

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (deuxième partie)

Post. des	SBR (N.M.F)	FCPR	II E R	Dys biologique	CIS	Invasif	Description	Stat.	Autres pathologies numériques	Blas
11	45	III/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, comedonien, III/III	/	1.5x1.2x1 cm. Pauvrement différencié, infiltrat inflammatoire	Fibroadénose	A10 A11
12	75	III/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant		/	3.5x3x2.2 cm. Peu différencié, masse solide et hétérogène, cellules sur des fins axes de tissu conjonctif. 2 populations de cellules tumorales: 1) avec peu de cytoplasme; 2) avec cytoplasme plus abondant et éosinophile. Foyers de nécrose.	T2N0Mx GLN 0/10	A9 A11 A12 A13
13	60	III/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, comedonien III/III 30%,	/	2.1x1.8x1 cm. Peu différencié. Syncytium de cellules malignes + cellules isolées, stroma desmoplastique, plaque centrale acellulaire. Un peu de nécrose, un peu d'infiltrat inflammatoire, microcalcifications.	T2N0Mx GLN 0/19	A8 A9 A10.
14	48	III/III (3,3,3)	-	-	Carcinome Médullaire		/	2.1x2x2 cm. 1 ravées et cordons confluents, parcours à certains endroits de nécrose. Plaque acellulaire, nécrotique centrale. Infiltrat inflammatoire.	T2N0Mx GLN 0/21	A9 A10 A11
15	42	III/III (2,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, comedonien III/III 10%,	Lymphatique	3x2.7x2.6 cm. Mal différencié, nappes de cellules cancéreuses séparées par stroma fibreux, par endroits desmoplastique; et inflammatoire surtout autour des foyers de CIS solide.	T2N2Mx (I.I.N 4/7	F8 F10 F11
16	54	II/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant bifocal	Cribiforme, solide, comedonien III/III <10%,	/	1.7x2.4x2.2 cm. Cordons cellules néoplasiques. Réaction desmoplastique au centre, un peu d'infiltrat inflammatoire en périphérie.	T2N0Mx T1N0Mx GLN 0/1	C7 C8 C10
17	49	II/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, cribiforme III/III	/	1.7x1.3x0.7 cm. Ilots de travées anastomosantes de cellules volumineuses avec cytoplasme abondant éosinophile. Fibrose. Infiltrat plasmocytaire dans stroma.	T1NxMx	A8 A9
18	45	II/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme III/III 10%,	Lymphatique	2.5x2.5x2.2 cm. Ilots et travées anastomosantes de cellules volumineuses rondes ou polygonales. (Grosse plaque acellulaire centrale, stroma fibreux.	T2N0Mx GLN 1/5	B8 B9 B10
19	45	II/III (3,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Comedonien cribiforme, II/III	/	2.2x1.6x1.5 cm.. Stroma desmoplastique, localement lymphoïde.	T2N0Mx GLN 0/1	A8 A9 A10.
20	43	II/III (2,3,3)	-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, I/III <1mm	/	2x1.2x1 cm. Peu différencié, plaque centrale acellulaire, fibrose. Légère inflammation en périphérie. Stroma desmoplastique?	T1N0Mx GLN 0/5	E8 E9 F10

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (troisième partie)

Projet	Age	SBR (N,M)	HR/PR	Type histologique	CIS	Invasivité	Description	Stade	Autres pathologies mammaires	Biops
20	43	III/III (2,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, I/III <1mm,	/	2x1.2x1cm. Peu différencié, plage centrale acellulaire, fibrose. Légère inflammation en périphérie. Stroma desmoplastique.	T1N0Mx GLN 0/5	Modifications sclérokystiques E8 E9 E10
21	75	III/III (3,3,2)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, cribriforme III/III	/	1.5x1.5x1.7 cm. Tapis de cellules, masse dense, stroma fibreux, nécrose, un peu d'inflammation en périphérie et autour tissu sain.	GLN 0/1	/
22	48	III/III (3,2,3)	-/-	-	Medullaire atypique	/	/	4x3.5x2.7 cm. Mal différencié, partiellement nécrotique. Fibrose et inflammation.	Inconnu	/
23	70	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	/	Travées anastomosantes de cellules volumineuses, rondes ou polygonales, zone de nécrose centrale, travées stroma fibreux	T2N0Mx GLN 0/9	/
24	66	III/III (2,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide II/III 5%	Lymphatique	3x3x4 cm. Pauvrement différencié. Plage acellulaire, fibrose centrale.	GLN 4/21	Changements fibrokystiques. A8 A13 A15 Métaplasie cylindrique
25	75	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	/	5.5x3x2.5 cm. Grosses cellules à cytoplasme clair, foyers de nécrose et d'inflammation.	GLN 1/1	/
26	42	III/III	-/-	-	Canalaire Infiltrant	solide III/III	/	Plusieurs foyers sans masse délimitée. Cellules très volumineuses. Stroma fibreux, inflammatoire autour tissu normal.	GLN 1/5	Modifications fibrokystiques. B8 B9 B12 Hyperplasie atypique.
27	51	III/III (3,3,3)	-/-	-	Medullaire	/	/	3.5x3.1x3 cm. Plages de nécrose, fibrose.	T2N0Mx GLN 0/13	Métaplasie apocrine. A8 A9 A11
28	61	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, comedonien II/III 30%	Pageoïde.	Multifocal, récidivant. Grosses cellules, gros cytoplasme éosinophile, un peu de nécrose, microcalcifications.	non applicabl c	/
29	43	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	Lymphatique, vasculaire.	1.8 x1.8x1.5 cm. Zone de fibrose centrale acellulaire, infiltration lymphocytaire. Foyers à sécrétion apocrine et à cellules claires.	GLN 1/2	Modifications fibrokystiques. C1 C2 Adénose sclérosante. C7
30	56	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide III/III	/	1x0.7x0.6 cm. Zone de fibrose centrale acellulaire, infiltration lymphocytaire en périphérie.	GLN 0/2	Métaplasie apocrine C7 Modifications fibrokystiques.

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (quatrième partie)

Projet	Age	SBR	PR/PR	H	Type histologique	CIS	Envasement	Description	Stade	Autres pathologies mammaires	Blocs
31	50	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, comédontien III/III 10%	Lymphatique	4x4x3.5 cm. Nécrose, infiltrat inflammatoire, stroma fibreux- desmoplastique.	GLN 0/7	Maladie fibrokystique.	D9 D10 D11
32	75	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	/	2.5x2x1.5 cm. Grandes plages de nécrose. Infiltrat inflammatoire.	GLN 0/17	Maladie fibrokystique. Métaplasie apocrine. Microcalcifications. Hyperplasie sans atypies.	B8 B9 B12
33	38	III/III (3,3,3)	-/-	-	Médullaire	/	/	4.5x3x4.5 cm. Tumeur bien délimitée composée d'un syncytium cellulaire avec infiltrat lymphoplasmocytaire en périphérie. Plages de nécrose.	GLN 0/28	/	A11 A14
34	84	III/III (3,3,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, solide, comédontien.	Lymphatique, cutanée.	21x12 cm. Tumeur mal délimitée. Infiltrat lymphoplasmocytaire.	GLN 9/9	/	A8 A18 A20
35	44	III/III (3,2,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide III/III	/	1.5 cm. Tumeur composée de syncytium de cellules avec beaucoup de plages de nécrose.	GLN 0/7	Maladie fibrokystique. Microfibroadénome.	A7 A9
36	52	III/III (3,3,3)	-/-	?	Canalaire Infiltrant	Solide, cribiforme. III/III 5%	Lymphatique.	3x2x2 cm. Cellules tumorales détachées les unes des autres. Infiltrat lymphocytaire. Microcalcifications.	GLN 6/18	Maladie fibrokystique. Métaplasie apocrine. Hyperplasie sans atypies. Ectasies canalaire.	A8 A9 A10,
37	50	III/III (3,2,3)	-/-	?	Canalaire Infiltrant	/	/	1.1x0.8x0.8 cm. Syncytium de cellules séparées de travées très riches en lymphocytes avec peu de stroma intra-tumoral.	GLN 0/8	Maladie fibrokystique.	A6 A7 A9
38	44	III/III (3,3,2)	-/-	?	Canalaire Infiltrant	/	Lymphatique, vasculaire, cutanée.	8x5x3 cm. Cordons de cellules néoplasiques dans un stroma lâche. Embolies tumorales vasculaires et lymphatiques extensives.	GLN 24/24	Maladie fibrokystique. Métaplasie apocrine.	A9 A10 A12

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (cinquième partie)

Patient	Age	SNR NALH	IRPR	H E R	IVP E R	CIS	Enveloppement	Description	Stade	Autres pathologies mammaires	Bios
39	55	III/III (3,2,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, solide III/III 20%	Lymphatique, perineural.	2,3x1,9x1,2 cm. Hétérogène. Cordons de cellules dans un stroma fibreux, fibrine. 2 populations de cellules, grandes à cytoplasme clair, petites et basophiles. Inflammation.	T2N0Mx GLN 0/13	Micro- adénomes	A8 A10A I2
40	47	III/III (3,3,2)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Solide III/III, 10%	Lymphatique, perineural	3,8x3,5x1 cm. Nids et travées de cellules hétérogènes. Un peu de nécrose, légère inflammation.	T2N3Mx GLN 23/36	Modifications sclérokystiques	A8 A10 A11
41	45	III/III (3,2,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Micropapilla ire, solide III/III > 50%	Lymphatique	0,8x0,7cm. Plupart tumeur CIS avec processus inflammatoire aigu et chronique, abcès. Inflammation et fibrose.	T1N1Mx GLN 1/30	Mastite aiguë et chronique, modifications sclérokystiques, métaplasie apocrine.	A25 A26
42	61	III/III (3,3,3)	-/-	+	Médullaire	/	/	2x1,6x2,1 cm. Aspect typique de carcinome médullaire avec un peu de nécrose.	T2N0Mx	/	G8 G9
43	73	III/III (3,2,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	comédonien solide III/III 25%	Lymphatique	2,8x2,8x2,5 cm. Cordons de cellules à grand cytoplasme éosinophile, lésion avec aspect oncocyttaire. Infiltrat lymphocytaire en périphérie et autour CIS, stroma un peu fibreux.	T2N0Mx GLN 0/1	Modifications sclérokystiques, adénose sclérosante microcalcifications.	B9
44	78	III/III (3,3,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme comédonien 10%	Lymphatique	2x1,4x2 cm. Tumeur bien délimitée, ferme, un peu moins cellulaire au centre. Inflammation en périphérie. Stroma un peu fibreux.	T1N1Mx GLN 1/3	/	D8 D9 D10
45	85	III/III (3,3,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme solide comédonien 20%	Paquetéide	1,2x1x1 cm. Mal différencié, cellules volumineuses à cytoplasme éosinophile, stroma desmoplastique.	T1N0Mx GLN 0/12	Modifications sclérokystiques. Métaplasie apocrine Adénose sclérosante.	A8 A9 A10
46	68	II/III (2,2,2)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme solide II/III 10%	/	1,5x1,5x1 cm. Amas de cellules avec cytoplasme éosinophile. Infiltrat inflammatoire, nécrose.	/	Métaplasie apocrine	A2 A3 A4 A5
47	48	III/III (3,3,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme solide comédonien multifocal 20%	Lymphatique	2x2x1,7cm. Travées anastomosantes de volumineuses cellules avec cytoplasme éosinophile.	T1N1Mx GLN 2/9	Modifications fibrokystiques.	A3 A8 A9
48	62	III/III (3,2,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	/	Sanguin, lymphatique, perineural.	4,5x4x3,5 cm. Peu différencié, composé de petites cellules éosinophiles. Quelques amas de cellules plus basophiles. Nécrose graisseuse.	T3N0Mx GLN 0/2	Modifications sclérokystiques. Hyperplasie atypique. Adénose sclérosante.	A58 A60 A61 A62
49	62	III/III 3,2,3	-/-	+	Canalaire Infiltrant	/	Lymphatique	2,9x2x1,6cm. Infiltrat lymphocytaire.	T2N1Mx GLN 1/3	/	A9 A10 A11

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (sixième partie)

Page	SUR- AGE NAVI	I/R PR	I/R	Type de lésion	CIS	Étiologie - Description	Nature	Autres pathologies malignantes - billes	
50	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Comédionien solide.	Sanguin	2.5x2.3x2 cm. Zone centrale nécrotique acellulaire, petits foyers de nécrose. Réaction lymphocytaire en hardue. Cellules polygonales décollées les unes des autres formant des groupes séparés par tissu conjonctif. Par endroits cellules syncytiales. Aspect hétérogène.	GLN 0/17 Ménstase hépatique	A7 A9
51	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, cribriforme.	Lymphatique, sanguin.	3x2.5x2.5 cm. Cordons de grosses cellules néoplasiques séparés par stroma fibreux.	T2N3Mx GLN 16/17	A7 A9
52	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, cribriforme. II/III	Lymphatique, sanguin, périneural.	1.4x1x0.7 cm. Haute densité de cellules tumorales avec faible participation du stroma. Foyers inflammatoires.	T1N3Mx GLN : 0/7	B7 B8 B10
53	III/III (2.3.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, cribriforme II/III	/	2.5x2.5x2 cm. Cellules tumorales de forme polygonale entourées d'un stroma inflammatoire.	T2N0Mx GLN 0/15	A9 A10
54	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide <5%	Lymphatique, sanguin.	1.5x1x1.2 cm. Cellules tumorales très atypiques et pléomorphes. Nécrose centrale. Infiltrat lymphocytaire important avec des follicules à centre germinatif.	GLN 1/21	A16 A17
55	III/III (2.3.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, comédionien. II/III	/	1 cm. Ilots cellulaires difformes, coalescents, formés de cellules avec de très nombreuses mitoses.	T1N0Mx GLN 0/1	B7 B10
56	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant avec différenciation apocrine.	Cribiforme, comédionien. II-III/III	Lymphatique	1x0.7 cm. Petite tumeur, très peu organisée. Cellules avec abondant cytoplasme éosinophile repoussant le noyau en périphérie. Différentiation apocrine.	GLN 13/20	A4
57	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Comédionien solide II-III/III	Lymphatique	1.7x1.5x1.4 cm. Cordons de cellules néoplasiques dans stroma lâche.	T1N1Mx GLN 1/1	A7 A8 A10
58	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Comédionien II/III <5%	/	2.4x2.4x2.2 cm. Architecture complexe de cellules très atypiques, nombreux foyers hémorragiques et nécrotiques.	T2N0Mx GLN 0/1	C9 C10 C11
59	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	/	/	1.5x1x1 cm. Traversée de cellules néoplasiques avec stroma fortement desmoplastique.	T1N0Mx GLN 0/2	C7 C9 C10
60	III/III (3.2.3)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, comédionien I, II, III, esp.	Lymphatique	3x3x2.3 cm. Cordons de cellules néoplasiques se développant dans nodule desmoplastique.	T2N0Mx GLN 0/9	A8 A9 A10

Tableau VII: Rapports pathologiques de la 2^{ème} cohorte (septième partie)

Projet	Age	SBR	ER/PR	HER-2	Type histologique	CIS	Enveloppement	Description	Stade	Autres pathologies notifiées	Blocs
61	59	III/III (2,3,3)	+/-	+	Canalaire Infiltrant	Solide III/III 10%	/	2x2x1 cm. Tumeur composée de petites cellules séparées par des fines fibres de tissu conjonctif.	T1N0Mx	Papillomes intracanalaire, infiltrat inflammatoire avec stéatonecrose.	A7 A8 A9
62	34	III/III (3,2,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Comédionien III/III 20%	Lymphatique	3x2x3 cm. Tumeur avec plage acellulaire centrale. Nécrose abondante. Stroma très inflammatoire.	GLN 2/3 T2N2Mx	/	B8 B9 B11
63	56	III/III (3,3,2)	+/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, solide. II/III 10%	/	2x1.3x2cm. Cellules néoplasiques en amas, dans stroma desmoplastique.	T1N0Mx GLN 0/1	Modifications sclérokystiques.	B7 B8 B10
64	47	I/III (1,1,1)	+/-	-	Canalaire Infiltrant	Solide, cribiforme II/III	/	1x1x0.8 cm. Carcinome bien différencié.	T1N0Mx GLN 0/1	Changements fibroadénomatoïdes.	B9
65	51	II/III (2,3,1)	-/-	?	Canalaire Infiltrant	Cribiforme II/III	/	0.8x0.6x0.5 cm. Cellules tumorales alignées en file indienne. Stroma riche en fibrine.	T1N0Mx GLN 0/2	/	C5
66	57	I/III (2,2,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	/	Lymphatique	2.5x2x1.5 cm. Cellules tumorales dispersées dans un stroma desmoplastique.	GLN 5/12	Modifications fibrokystiques.	B7 B8 B9
67	54	II/III (2,2,3)	-/-	-	Canalaire Infiltrant	Cribiforme, comédionien. II-III/III	Lymphatique	1.2x1.1x1cm. Cellules tumorales en nappe, plusieurs foyers de nécrose, infiltrat inflammatoire en périphérie.	GLN 0/1	Modifications fibrokystiques, métaplasie apocrine.	B7 B8 B9
68	58	II/III (2,2,3)	-/-	+	Canalaire Infiltrant	Cribiforme II/III	Lymphatique	1.4x1.2x1.3 cm. Cellules tumorales en amas dans stroma lâche.	GLN 1/13	Modifications fibrokystiques, métaplasie apocrine, microcalcifications.	A1 A3

Légende: **Projet** : le numéro correspond au numéro du cas. **SBR** : Grade de la tumeur d'après le système SBR (I à III/III.) Entre parenthèses : le 1^{er} chiffre correspond au grade nucléaire (N), le deuxième au grade mitotique (M), le troisième au grade histologique (H). **ER/PR** : statut des récepteurs hormonaux d'après les rapports du CHUM. **HER-2** : statut de HER-2 d'après les rapports du CHUM. **Description** : La taille de la tumeur est indiquée en cm. **Stade** : d'après la classification TNM. **GLN** : ganglions envahis par la tumeur sur le nombre total de ganglions examinés en pathologie. **Blocs** : Les blocs indiqués correspondent aux blocs tumoraux choisis pour la construction de la MMT.

II.2 Résultats en IHC sur MMT

Nous avons retrouvé trente-deux tumeurs, parmi les 61 cas analysables, composées, en partie ou en totalité, de cellules cancéreuses exprimant au moins un marqueur basal en IHC.

52% de notre cohorte "finale" est donc composée de tumeurs exprimant de caractères basaux par IHC. De ces trente-deux tumeurs, 20 (62%) ont exprimé conjointement au moins trois marqueurs basaux; deux cas ont exprimé tous les marqueurs basaux (cas 30 et 58).

Dix cas (31%) ont exprimé un seul marqueur basal, et trois cas (9%) ont exprimé deux marqueurs basaux (CK5 et CK17, EGFR et CK5, EGFR et CK17).

La CK14 a toujours été exprimée avec, au minimum, deux autres marqueurs basaux. Tous les autres marqueurs basaux ont été soit exprimés de façon isolée dans certaines tumeurs, soit conjointement aux autres marqueurs basaux.

90% des tumeurs avec un phénotype basal en IHC sont des tumeurs qui n'expriment pas les récepteurs hormonaux et ne présentent pas d'amplification du gène HER-2. Par ailleurs, 78% des tumeurs de haut grade avec un phénotype "triple négatif" sont des carcinomes avec des caractéristiques basales.

De nouveau, comme dans la cohorte préliminaire, nous avons retrouvé le phénotype basal dans des tumeurs ayant une amplification de HER-2 (cas 44 et 50); et dans une tumeur exprimant uniquement les récepteurs à la progestérone (cas 58).

Le marqueur le plus exprimé a été la CK5, qui est présent dans 41% des tumeurs de la cohorte. La CK17 est exprimée dans 36% des tumeurs, la CK14 dans 26% des tumeurs, l'EGFR dans 24%, et l'aSMA dans 16% des cas.

Nous avons éprouvé des difficultés à évaluer le marquage à la CK17, à cause d'un bruit de fond marqué. Nous avons donc uniquement considéré comme positives, les tumeurs ayant une intensité du marquage supérieure à celle des contrôles négatifs.

Nos analyses statistiques (voir ci dessous) nous ont permis de confirmer une corrélation d'expression statistiquement significative entre nos différents marqueurs basaux (à l'exception de la CK14 avec l'aSMA). La confection des marquages au sein des lames superposées nous a permis de confirmer que les différentes CK basales sont souvent exprimées dans les mêmes groupes de cellules tumorales. Par contre, dans beaucoup de cas, l'expression conjointe de CK basales et d'aSMA au sein d'une même tumeur concerne des groupes cellulaires tumoraux distincts.

La majorité des tumeurs ont exprimé les marqueurs apicaux; mais, 24% et 33% des tumeurs sont respectivement composées, en partie, ou en totalité, de cellules tumorales silencieuses pour ces marqueurs.

Les deux tableaux suivants résument les données obtenues.

Tableau VIII: Récapitulation des données en IHC et FISH (HER-2) pour la cohorte finale

Marqueur		% de tumeurs	Type de marquage
ER (absence / présence des récepteurs)		83.82% / 16.18%	N
PR (absence / présence des récepteurs)		82.35% / 17.65%	N
HER-2 (absence / présence d'amplification)		72.06% / 27.94%	N
PHEN. TRIPLE NEGATIVE (presence/absence)		61.76% / 38.24%	
B_EGFR (pas d'expression / expression)		76.27% / 23.73%	P
B_CK5 (pas d'expression / expression)		59.02% / 40.98%	P et C
B_CK17 (pas d'expression / expression)		63.93% / 36.07%	P et C
B_CK14 (pas d'expression / expression)		73.77%/ 26.23%	P etC
B_SMA (pas d'expression / expression)		83.61%/ 16.39%	P etC
L_CK19	0 (pas d'expression)	11.86%	P etC
	1 (faible expression)	13.56%	P etC
	2 (forte expression)	74.58%	P etC
L_EMA	0 (pas d'expression)	13.33%	P etC
	1 (faible expression)	20.00%	P etC
	2 (forte expression)	66.67%	P etC
AGE		Moyenne: 56.01; sd: 12.41	

Légende: B_ : marqueur des cellules basales, L_ : marqueur de cellules luminales. sd: dérivation standard. Pour le système d'évaluation des résultats se référer au tableau V de matériels et méthodes. N : Nucleaire. P : Perimembranaire. C : Cytosolique.

Tableau IX: Résultats en IHC de la cohorte finale (première partie)

Cas	Âge	M. BASAUX								Total	LUMINAUX	
		ER	PR	HER2	EGFR	CK5	CK17	CK14	SMA		CK19	EMA
1	46	-	-	-	0	1	0	0	0	1	2	1
2	57	-	-	-	1	1	1	1	0	4	2	1
3	59	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	2
4	44	-	-	-
5	72	-	-	-	1	1	1	1	0	4	2	2
6	60	-	-	-	0	0	0	0	0	0	2	2
7	44	-	-	-
8	55	-	-	-	0	0	0	0	0	0	2	2
9	60	-	-	-	.	1	1	1	0	3	.	.
10	41	-	-	-
11	45	-	-	-	1	1	1	1	0	4	1	0
12	75	-	-	-	1	0	0	0	0	1	0	0
13	60	-	-	-	1	1	1	0	1	4	2	0
14	48	-	-	-	0	0	0	0	0	0	2	2
15	42	-	-	-	1	1	1	0	1	4	2	2
16	54	-	-	-	0	0	1	0	0	1	2	2
17	49	-	-	-	0	0	1	0	0	1	0	2
18	45	-	-	-	0	1	1	1	0	3	2	2
19	45	-	-	-	1	0	0	0	0	1	2	2
20	43	-	-	-	1	1	0	1	0	3	1	2
21	75	-	-	-	0	1	1	0	0	2	2	2
22	48	-	-	-
23	70	-	-	-	1	1	1	0	0	3	0	0
24	66	-	-	-	0	1	0	0	0	1	2	1
25	75	-	-	-	0	1	0	0	0	1	1	0
26	42	-	-	-
27	51	-	-	-	0	1	1	1	1	4	1	1
28	61	-	-	-	1	1	0	1	1	4	1	1
29	43	-	-	-	0	0	0	0	1	1	2	1
30	56	-	-	-	1	1	1	1	1	5	2	1
31	50	-	-	-	0	1	1	1	0	3	2	2
32	75	-	-	-	0	1	1	1	0	3	1	1
33	38	-	-	-	0	1	0	0	0	1	2	1
34	84	-	-	-	0	0	0	0	0	0	1	2
35	44	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1
36	52	-	-	-	0	1	1	1	0	3	1	0
37	50	-	-	-	1	0	0	0	0	1	2	2
38	44	-	-	-	0	1	1	1	0	3	2	2
43	73	-	-	-	1	1	0	0	0	2	2	2
65	51	-	-	-	0	0	0	0	0	0	2	2
66	57	-	-	-	0	0	0	0	0	0	2	2
67	54	-	-	-	1	1	1	0	1	4	2	1

Légende: **Cas:** les carcinomes basaux identifiés sont colorés en jaune. **ER:** statut des récepteurs d'oestrogène par IHC, - : pas d'expression, +: expression. **PR:** statut des récepteurs à progestérone par IHC, - : pas d'expression, +: expression. (Voir système d'évaluation au tableau V). **HER-2:** statut du gène HER-2 par FISH. -: pas d'amplification, +: amplification. **Marqueurs basaux:** statut des marqueurs basaux (EGFR/HER-1, CK5, CK14, CK17, aSMA) en IHC. 0 = pas d'expression. 1 = expression. (Voir système d'évaluation au tableau V). La dernière colonne indique le nombre total de marqueurs basaux exprimés. **Marqueurs luminaux:** statut des marqueurs luminaux (EMA et CK19) en IHC. 0 = pas d'expression du marqueur. 1 = faible expression du marqueur. 2 = forte expression du marqueur. (Voir système d'évaluation au tableau V). . = résultat non disponible.

Tableau IX: Résultats en IHC de la cohorte finale (deuxième partie)

Cas	Âge	M. BASAUX							M. LUMINAUX		
		ER	PR	HER2	EGFR	CK5	CK17	CK14	SMA	CK19	EMA
39	55	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
40	47	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
41	45	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
42	61	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
44	78	-	-	+	0	1	1	1	0	3	0
45	85	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
46	88	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
47	48	-	-	+	0	0	0	0	0	0	2
48	62	-	-	+
49	62	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2
50	50	-	-	+	1	0	1	0	0	2	0
51	57	+	+	-	0	0	0	0	0	2	2
52	65	+	-	-	0	0	0	0	0	2	0
53	51	-	+	+	0	0	0	0	0	2	2
54	74	+	-	-	0	0	0	0	0	2	1
55	56	+	+	-	0	0	0	0	0	2	2
56	42	+	+	+	0	0	0	0	0	2	2
57	32	+	+	-	0	0	0	0	0	2	2
58	62	-	+	-	1	1	1	1	1	5	2
59	72	+	+	+	0	0	0	0	0	2	2
60	80	+	+	+	0	0	0	0	0	1	2
61	59	+	+	+	0	0	0	0	0	2	2
62	34	-	+	+	0	0	0	0	0	2	2
63	56	+	+	+
64	47	+	+	-	0	0	0	0	0	2	2
68	58	-	-	+	0	0	0	0	0	2	2

Légende: Cas: les carcinomes basaux identifiés sont colorés en jaune. **ER:** statut des récepteurs d'œstrogène par IHC, - : pas d'expression, +: expression. **PR:** statut des récepteurs à progestérone par IHC, - : pas d'expression, +: expression. (Voir système d'évaluation au tableau V). **HER-2:** statut du gène HER-2 par FISH. - : pas d'amplification, +: amplification. **Marqueurs basaux:** statut des marqueurs basaux (EGFR/HER-1, CK5, CK14, CK17, aSMA) en IHC. 0 = pas d'expression. 1 = expression. (Voir système d'évaluation au tableau V). La dernière colonne indique le nombre total de marqueurs basaux exprimés. **Marqueurs luminaux:** statut des marqueurs luminaux (EMA et CK19) en IHC. 0 = pas d'expression du marqueur. 1 = faible expression du marqueur. 2 = forte expression du marqueur. (Voir système d'évaluation au tableau V). . = résultat non disponible.

II.3 Analyse statistique

Association de l'expression des marqueurs basaux au phénotype "triple négatif"

D'après les tests *Pearson Chi-square*, et *Fisher exact test*, l'expression des marqueurs: EGFR ($p=0.0213$), CK5 ($p<0.0001$), CK17 ($P=0.0020$) et CK14 ($p=0.0105$), est associé au phénotype triple négatif.

En ce qui concerne l'aSMA, une telle association n'est pas démontrée (*Fisher exact test*)

Association de l'expression des marqueurs basaux aux marqueurs luminaux

Avec la CK19:

D'après le *Fisher exact test* il n'y a pas d'association pour l'expression d'aucun marqueur basal à la CK19. ($p=0.8870$ pour le EGFR; $p=0.3390$ pour la CK5; $p=0.2781$ pour la CK17, $p=0.1827$) pour la CK14, et $p=0.8420$ pour la aSMA)

Avec l'EMA

EGFR et EMA: Il n'y a pas d'association significative d'après le test *Fisher*.

CK5 et EMA: Le test *Fisher* nous indique qu'il y a une association. Le tableau IX montre que, les cas n'exprimant pas ou faiblement l'EMA, marquent en majorité pour la CK5. Par ailleurs, les cas n'exprimant pas

la CK5, sont plus nombreux parmi les cas exprimant l'EMA. L'association semble donc une association négative.

CK17 et EMA: Le test de *Pearson* indique une association. Comme dans le cas de la CK5, on peut présager qu'il s'agit d'une association négative. En effet parmi les cas exprimant l'EMA, la majorité ne marque pas pour la CK17.

CK14 et EMA: Il n'y a pas d'association significative d'après le *test de Pearson*.

aSMA et EMA: Le test de *Pearson* indique une association. En comparant les fréquences d'expression des deux marqueurs, on peut présager qu'il s'agit d'une association négative.

Association des marqueurs luminaux au phénotype triple négatif

Nous n'avons pas trouvé d'association (positive ou négative) entre l'expression de la CK19 et le phénotype triple négatif. Par contre, pour l'EMA, l'expression est négativement associée au phénotype triple négatif d'après le test de *Fisher*.

Corrélation d'expression entre les différents marqueurs basaux

EGFR et CK5: Aussi bien le test de *Pearson* ($p=0.0005$) que le test de *Fisher* ($P=0.0011$) indiquent une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

EGFR et CK17: Le test de *Fisher* ($p= 0.0097$) indique une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

EGFR et CK14 : Le test de *Fisher* ($p= 0.0137$) indique une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

EGFR et aSMA: Le test de *Fisher* ($p= 0.0079$) indique une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

CK5 et CK17: Tant le test de *Pearson* ($p<0.0001$), que le test de *Fisher* ($p<0.0001$)) indiquent une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

CK5 et CK14: Tant le test de *Pearson* ($p<0.0001$), que le test de *Fisher* ($p<0.0001$)) indiquent une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

CK5 et aSMA: Le test de *Fisher* ($p= 0.0112$)) indique une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

CK17 et CK14: Tant le test de *Pearson* ($p < 0.0001$), que le test de *Fisher* ($p < 0.0001$) indiquent une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

CK17 et aSMA: Le test de *Fisher* ($p = 0.0272$) indique une association positive pour l'expression entre ces deux marqueurs.

CK14 et aSMA: Il n'y a pas d'association pour l'expression entre ces deux marqueurs d'après le test de *Fisher*.

Association des marqueurs basaux à l'âge

Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre l'âge des patientes présentant des tumeurs sans phénotype basal en IHC, et l'âge des patientes avec des tumeurs exprimant ce phénotype. Ceci est valable pour tous les marqueurs basaux.

II.4 Carcinome in situ et marqueurs basaux

Comme attendu, les CK basales ainsi que l'aSMA ont marqué positivement les cellules bordant les lésions de CIS. L'EGFR n'a pas été retrouvé comme marqueur basal des CIS.

Par ailleurs, et ceci est inattendu, certaines cellules tumorales à l'intérieur des lésions in situ ont marqué positivement à la CK5, indépendamment du fait que la portion invasive de la tumeur soit de phénotype basal ou non.

II.5 Données morphologiques des tumeurs avec des caractéristiques basales en IHC

Notre deuxième cohorte nous a permis de mieux cerner les principales caractéristiques histologiques de ces tumeurs. Il s'agit des caractéristiques suivantes: nécrose étendue, inflammation et desmoplasie.

Tout de même, ces caractéristiques ne semblent pas exclusives aux carcinomes à phénotype basal. (Voir le tableau VII)

II.6 Illustrations

Les tumeurs à phénotype basal identifiés dans la deuxième cohorte sont illustrées dans les figures suivantes (figure 5 à figure 32). Chaque figure est constituée de plusieurs photographies provenant d'une même tumeur.

Pour éviter d'alourdir le document, un code à six éléments a été assigné pour chaque photographie.

Le système de codification est le suivant :

1. **Identification de la photographie** par une lettre de A à W.
2. **Identification de la MMT contenant la tumeur** : 2.1, 2.2, 2.3 (cf. chapitre *Matériels et Méthodes*).
3. **Identification de la carotte tumorale au sein de la MMT**. Ceci est fait par une lettre (A, B ou D) et un chiffre (1 à 68). La lettre identifie la sub-micromatrice contenant la carotte, le chiffre correspond au cas tumoral ou est prélevée la carotte (cf. chapitre *Matériels et Méthodes*).

4. **Identification de la partie de la carotte photographiée :** (dans les cas où deux illustrations par carotte sont représentées) h = moitié supérieure de la carotte; b = moitié inférieure de la carotte.
5. **Identification de la coloration/ marquage en IHC de l'illustration.**
Nous avons photographié pour chacune des tumeurs basales illustrées, chacun des dix marquages réalisés en IHC (ER, PR, EGFR/HER-1, CK5, CK5/6, CK14, CK17, CK19, EMA, aSMA), ainsi que la coloration HPS.
6. **Agrandissement de la photographie.** La plupart des photographies ont été prises à 100x, cet agrandissement permet la visualisation quasi complète de la carotte. Dans certains cas, les photographies ont été prises à 200x pour mieux illustrer certains marquages.

Exemple : B.2.1 A2hER100x. (Figure 5)

Il s'agit de la photographie B de l'illustration 5 (cas 2). La photographie a été prise au sein de la MMT 2.1. Il s'agit de la carotte provenant du carcinome n° 2 et placée dans la sub-micromatrice A. Le marquage illustré correspond au marquage en IHC avec l'antigène ER. La photographie a été prise à 100x.

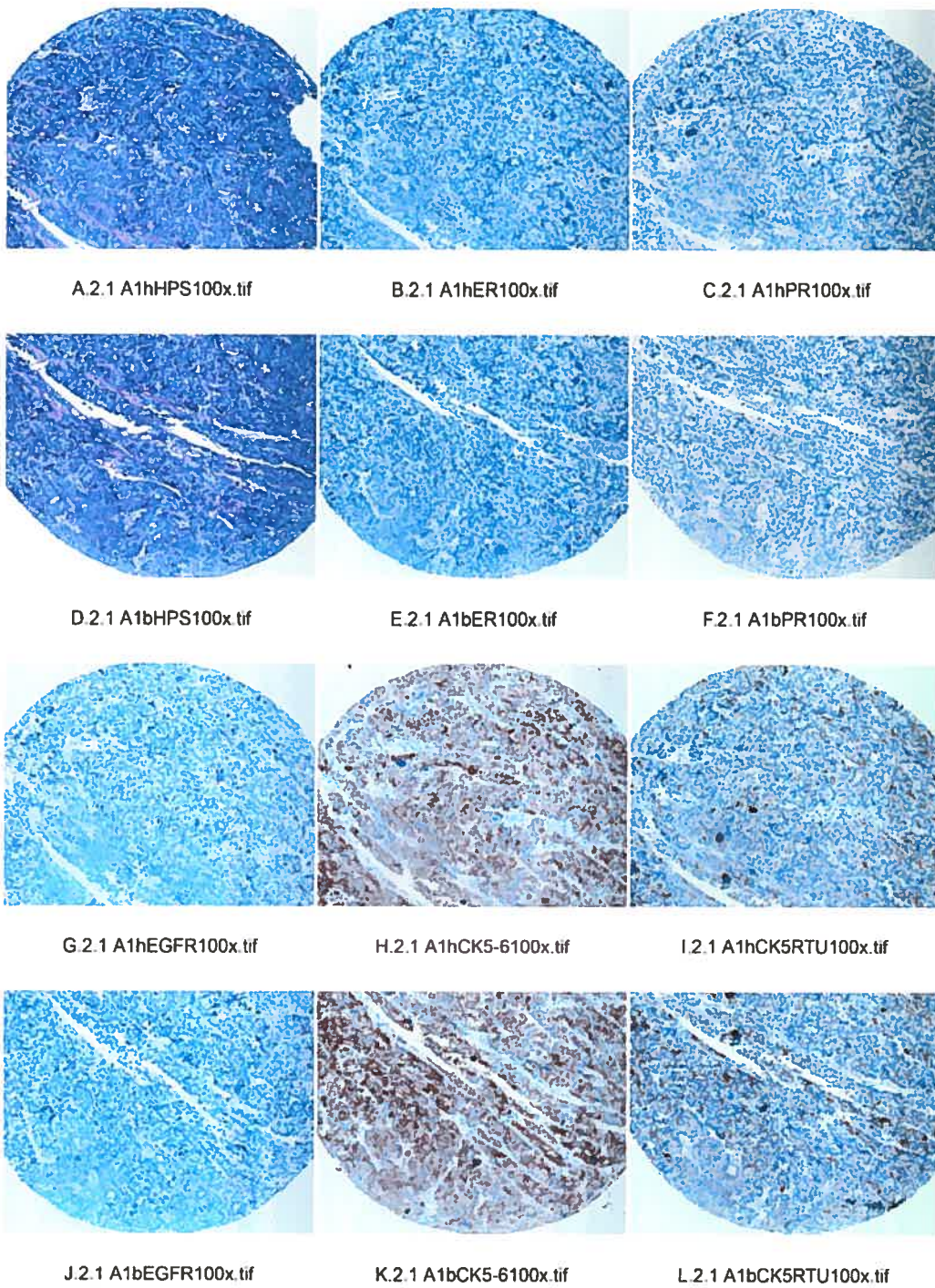
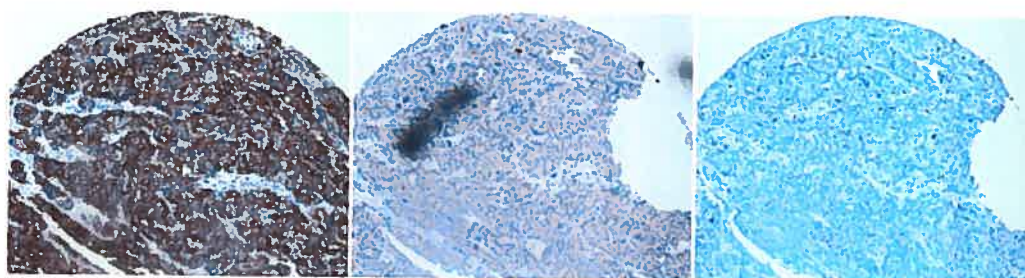
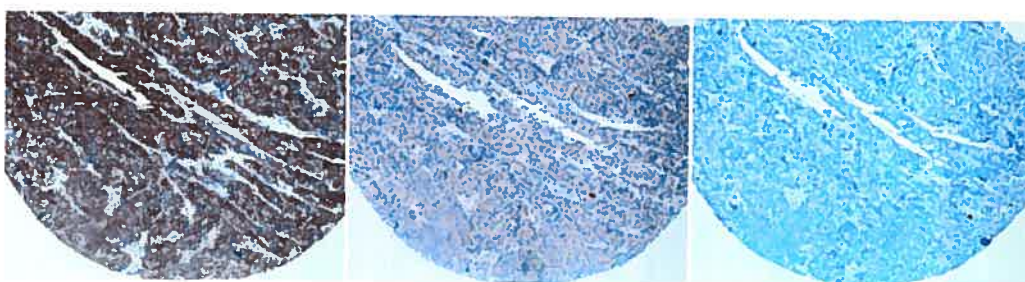
Figure 5 : Cas 1 (première partie)

Figure 5 : Cas 1 (deuxième partie)

M.2.1 A1hCK19100x.tif

N.2.1 A1hCK17100x.tif

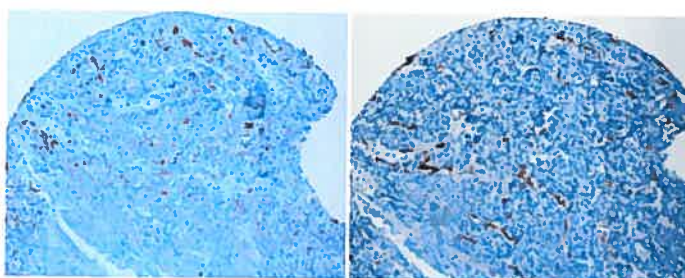
O.2.1 A1hCK14100x.tif



P.2.1 A1bCK19100x.tif

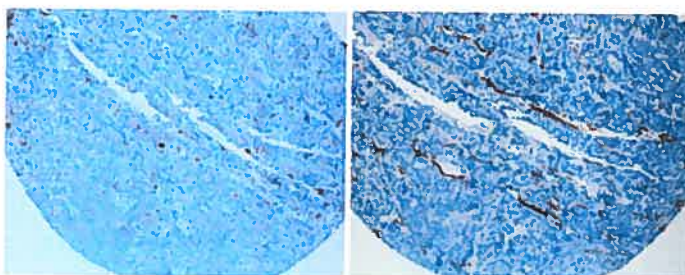
Q.2.1 A1bCK17100x.tif

R.2.1 A1bCK14100x.tif



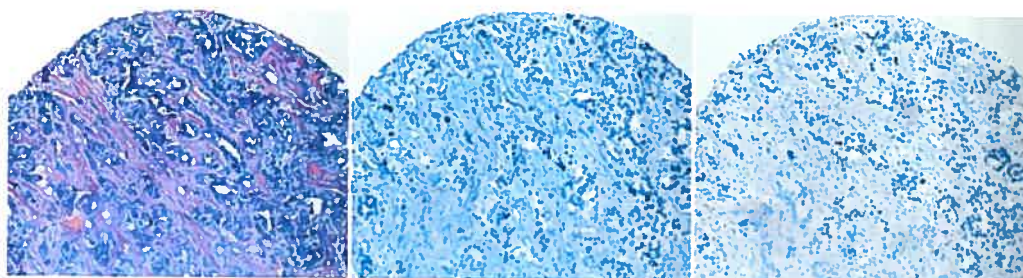
S.2.1 A1hEMA100x.tif

T.2.1 A1hSMA100x.tif



U.2.1 A1hEMA100x.tif

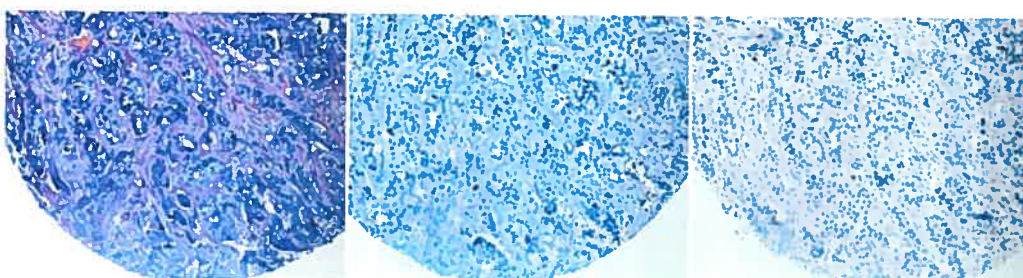
V.2.1 A1bSMA100x.tif

Figure 6 : Cas 2 (première partie)

A.2.1 A2hHPS100x.tif

B.2.1 A2hER100x.tif

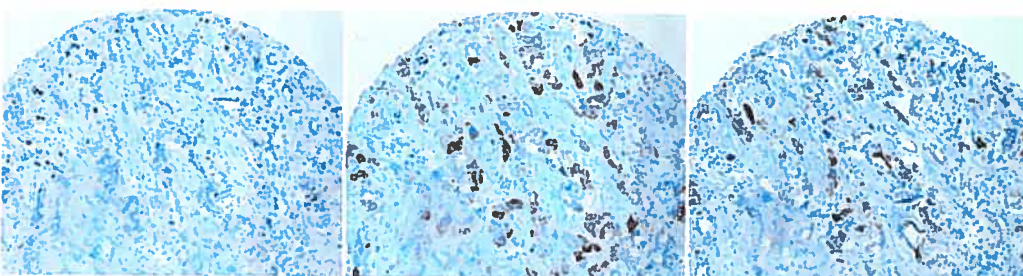
C.2.1 A2hPR100x.tif



D.2.1 A2bHPS100x.tif

E.2.1 A2bER100x.tif

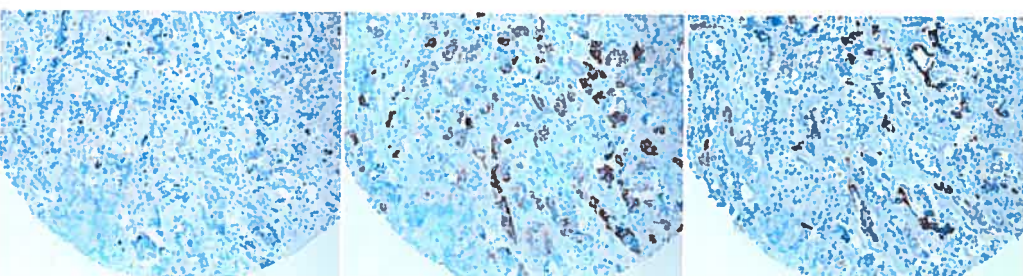
F.2.1 A2bPR100x.tif



G.2.1 A2hEGFR100x.tif

H.2.1 A2hCK5-6100x.tif

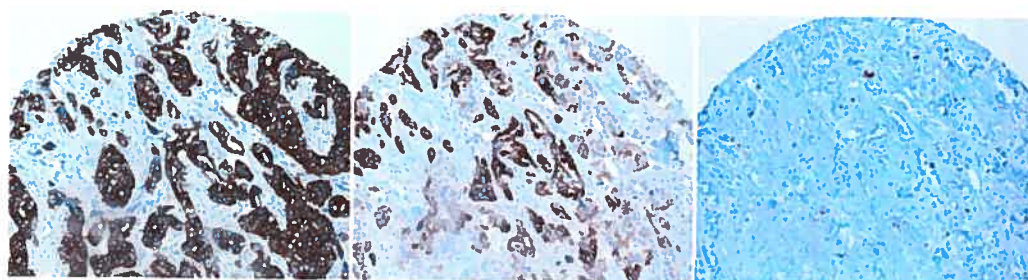
I.2.1 A2hCK5RTU100x.tif



J.2.1 A2bEGFR100x.tif

K.2.1 A2bCK5-6100x.tif

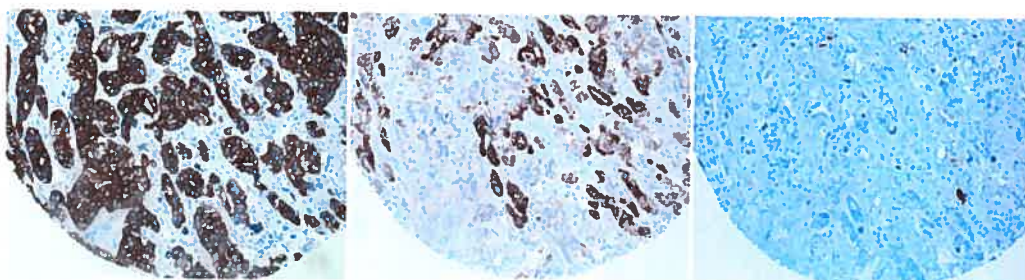
L.2.1 A2bCK5RTU100x.tif

Figure 6 : Cas 2 (deuxième partie)

M.2.1 A2hCK19100x.tif

N.2.1 A2hCK17100x.tif

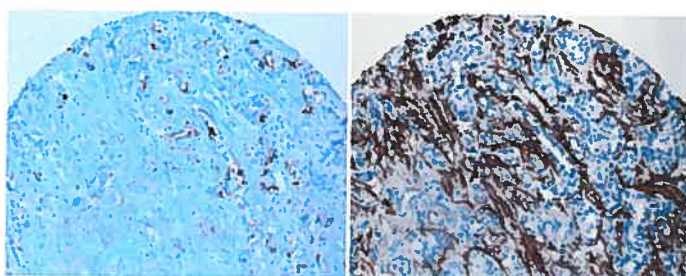
O.2.1 A2hCK14100x.tif



P.2.1 A2bCK19100x.tif

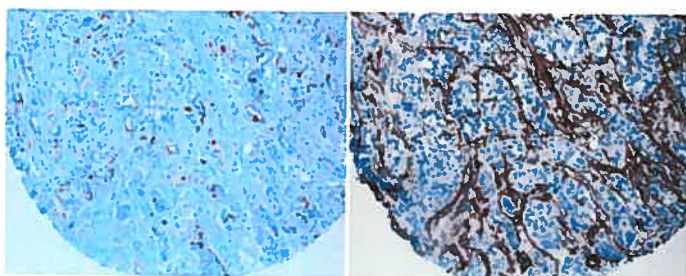
Q.2.1 A2bCK17100x.tif

R.2.1 A2bCK14100x.tif



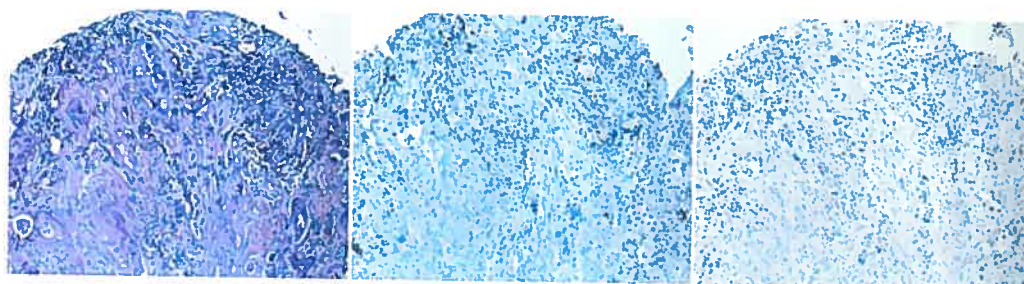
S.2.1 A2hEMA100x.tif

T.2.1 A2hSMA100x.tif



U.2.1 A2bEMA100x.tif

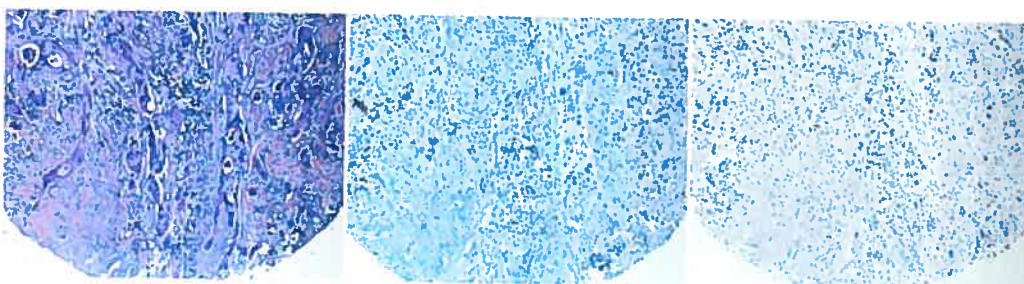
V.2.1 A2bSMA100x.tif

Figure 7 : Cas 5 (première partie)

A.2.1 A5hHPS100x.tif

B.2.1 A5hER100x.tif

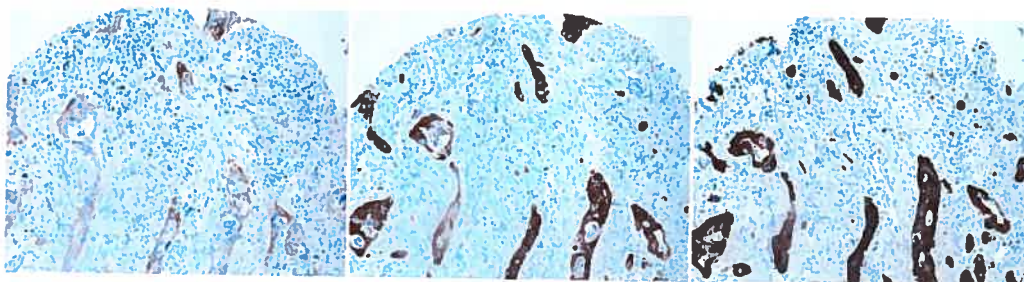
C.2.1 A5hPR100x.tif



D.2.1 A5bHPS100x.tif

E.2.1 A5bER100x.tif

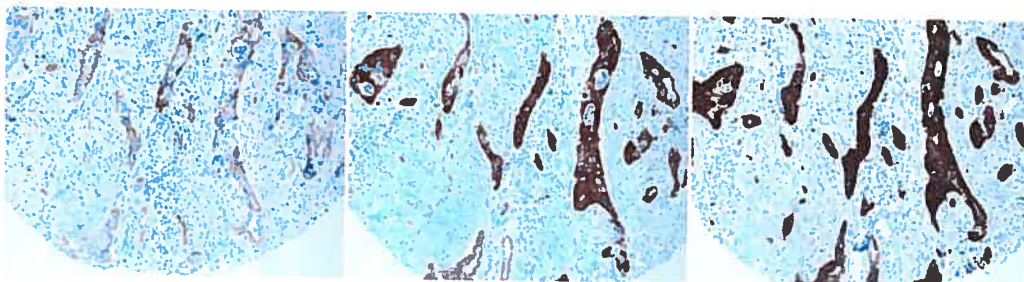
F.2.1 A5bPR100x.tif



G.2.1 A5hEGFR100x.tif

H.2.1 A5hCK5-6100x.tif

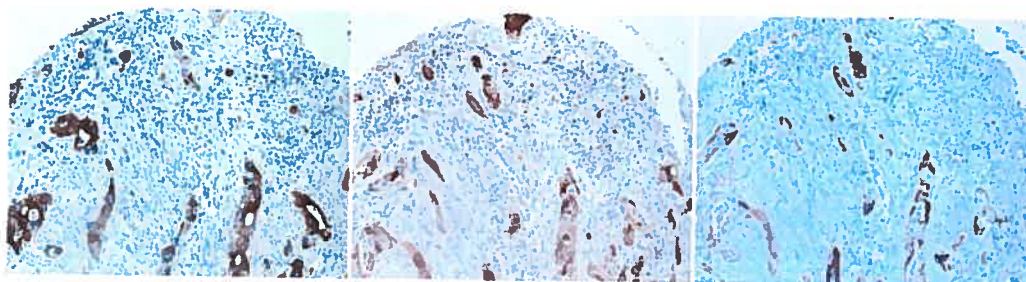
I.2.1 A5hCK5RTU100x.tif



J.2.1 A5bEGFR100x.tif

K.2.1 A5bCK5-6100x.tif

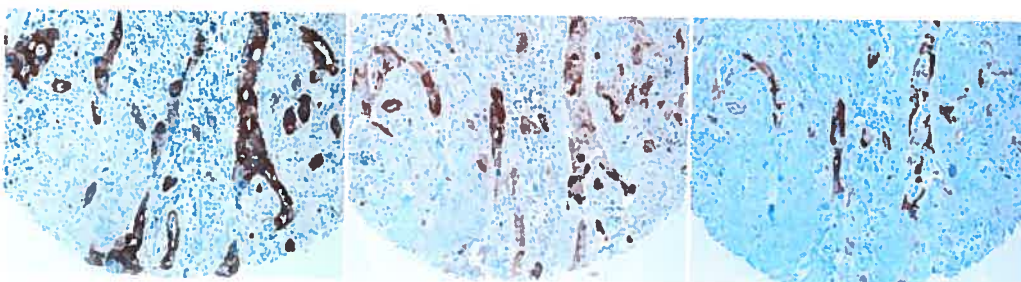
L.2.1 A5bCK5RTU100x.tif

Figure 7 : cas 5 (deuxième partie)

M.2.1 A5hCK19100x.tif

N.2.1 A5hCK17100x.tif

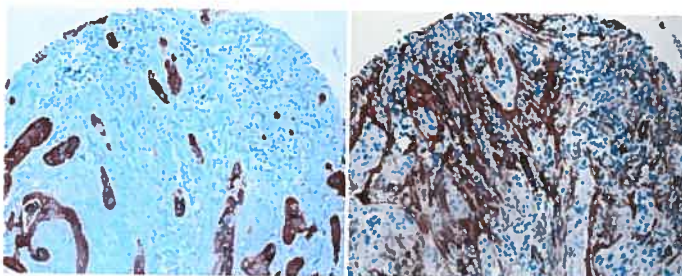
O.2.1 A5hCK14100x.tif



P.2.1 A5bCK19100x.tif

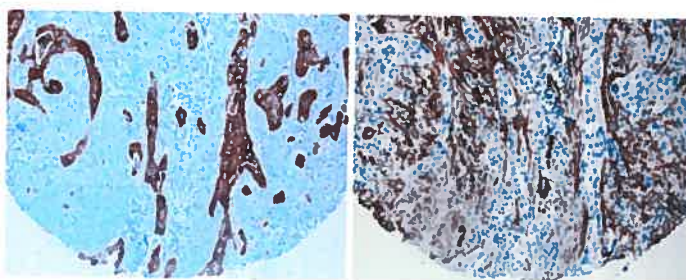
Q.2.1 A5bCK17100x.tif

R.2.1 A5bCK14100x.tif



S.2.1 A5hEMA100x.tif

T.2.1 A5hSMA100x.tif



U.2.1 A5bEMA100x.tif

V.2.1 A5bSMA100x.tif

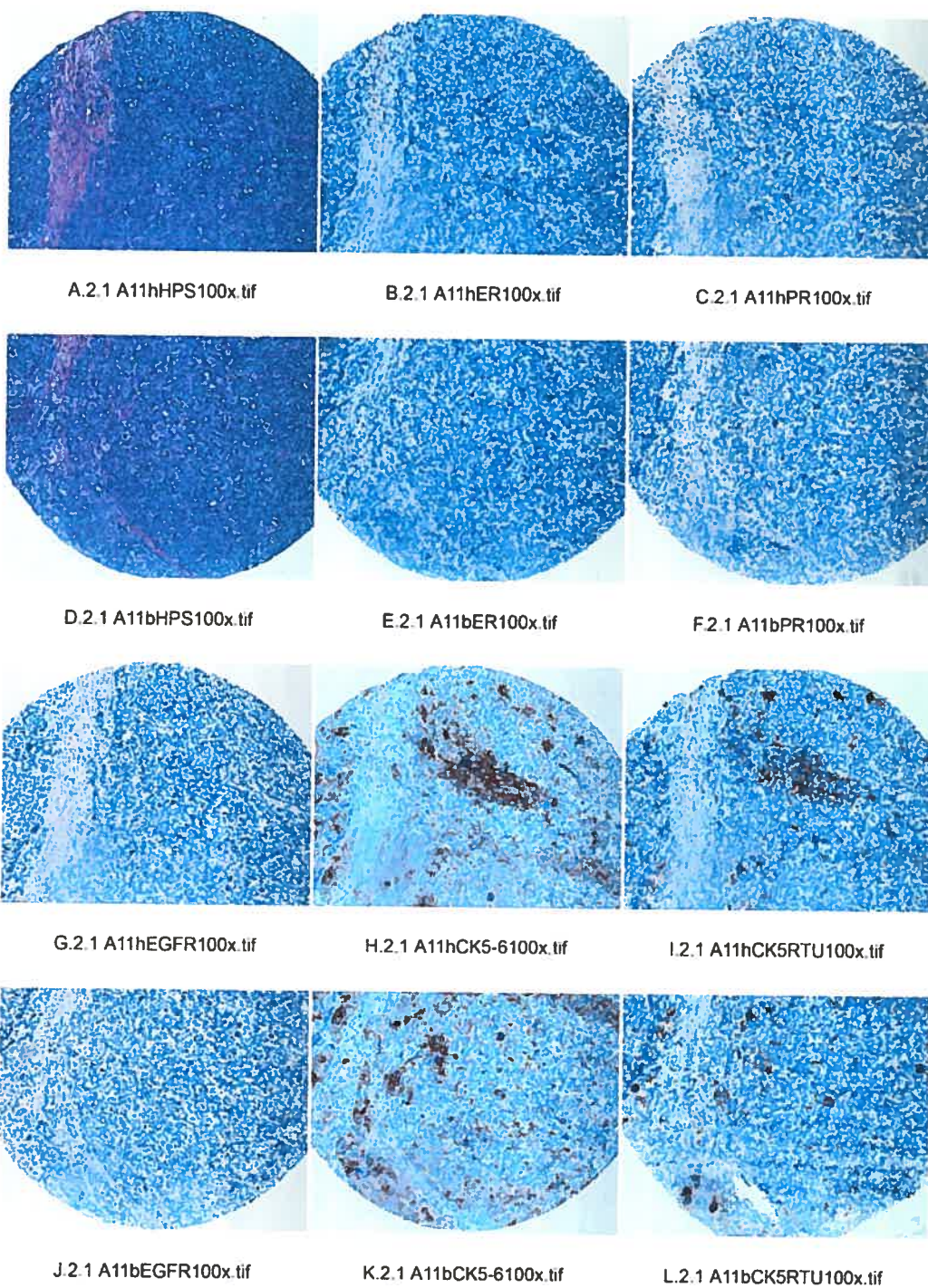
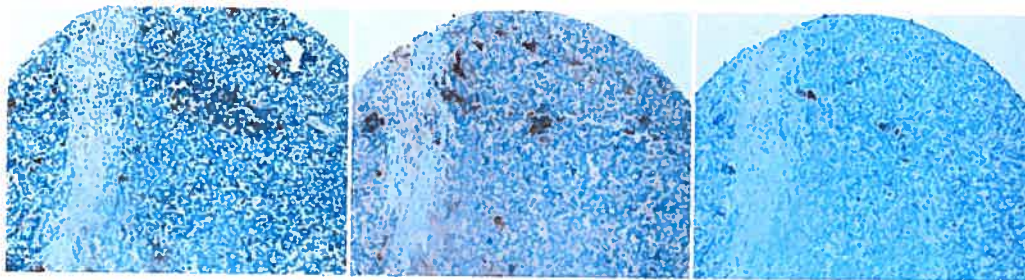
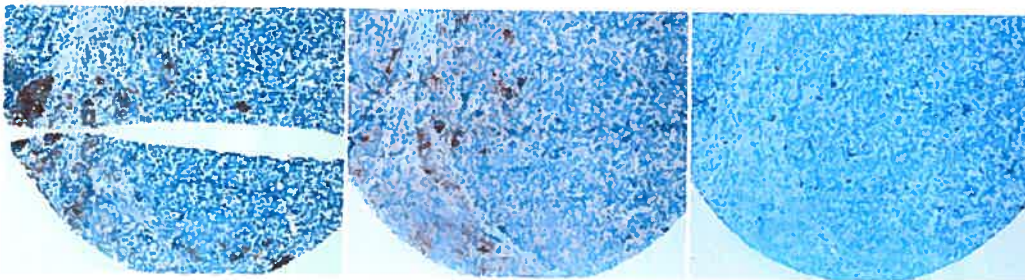
Figure 8 : Cas 11 (première partie)

Figure 8 : Cas 11 (deuxième partie)

M.2.1 A11hCK19100x.tif

N.2.1 A11hCK17100x.tif

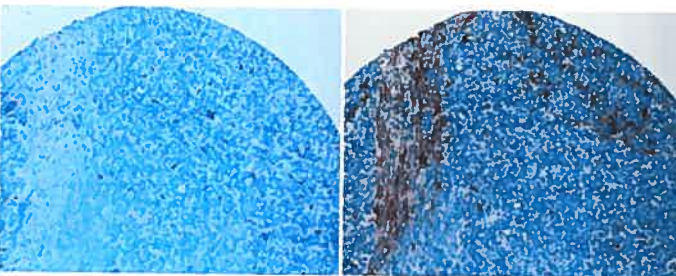
O.2.1 A11hCK14100x.tif



P.2.1 A11bCK19100x.tif

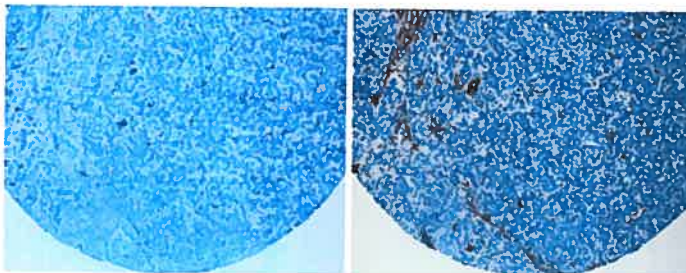
Q.2.1 A11bCK17100x.tif

R.2.1 A11bCK14100x.tif



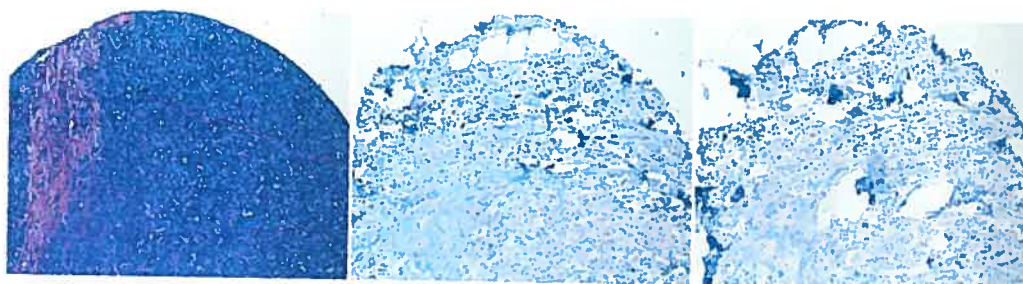
S.2.1 A11hEMA100x.tif

T.2.1 A11hSMA100x.tif



U.2.1 A11bEMA100x.tif

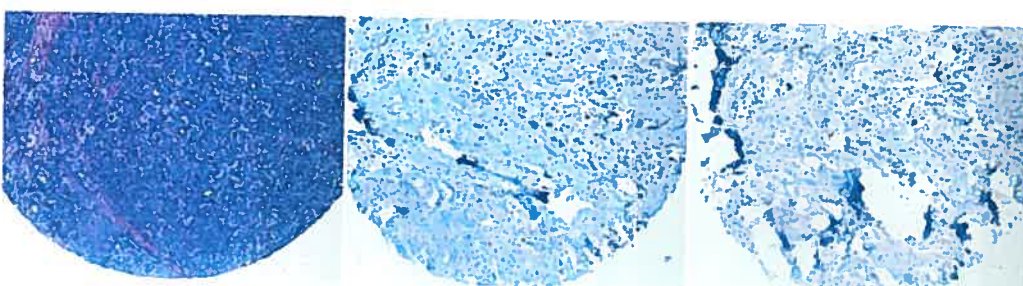
V.2.1 A11bSMA100x.tif

Figure 9 : Cas 12 (première partie)

A.2.1 A12hHPS100x.tif

B.2.1 A12hER100x.tif

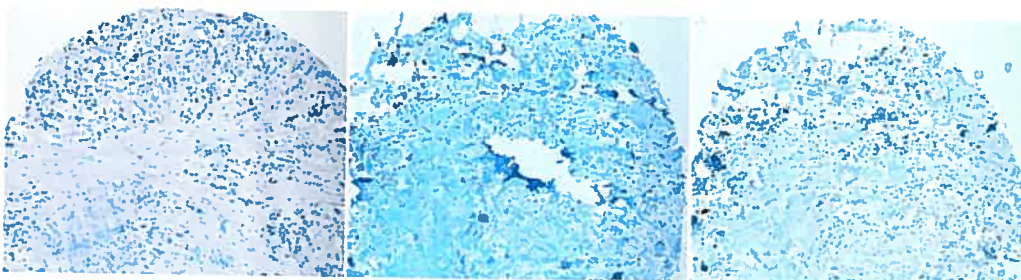
C.2.1 B12hPR100x.tif



D.2.1 A12bHPS100x.tif

E.2.1 A12bER100x.tif

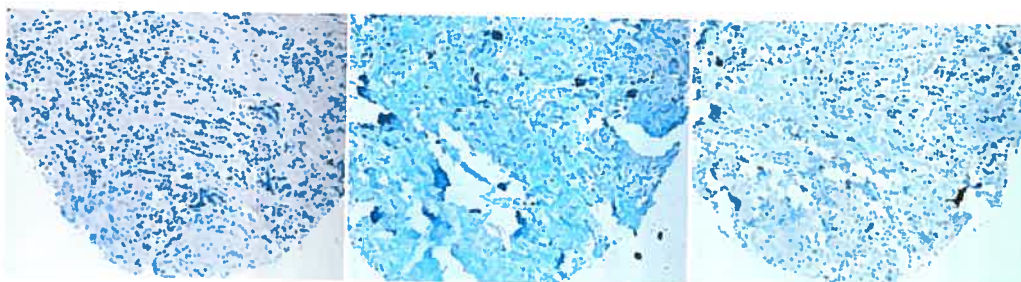
F.2.1 B12bPR100x.tif



G.2.1 A12hEGFR100x.tif

H.2.1 A12hCK5-6100x.tif

I.2.1 B12hCK5RTU100x.tif



J.2.1 A12bEGFR100x.tif

K.2.1 A12bCK5-6100x.tif

L.2.1 B12bCK5RTU100x.tif

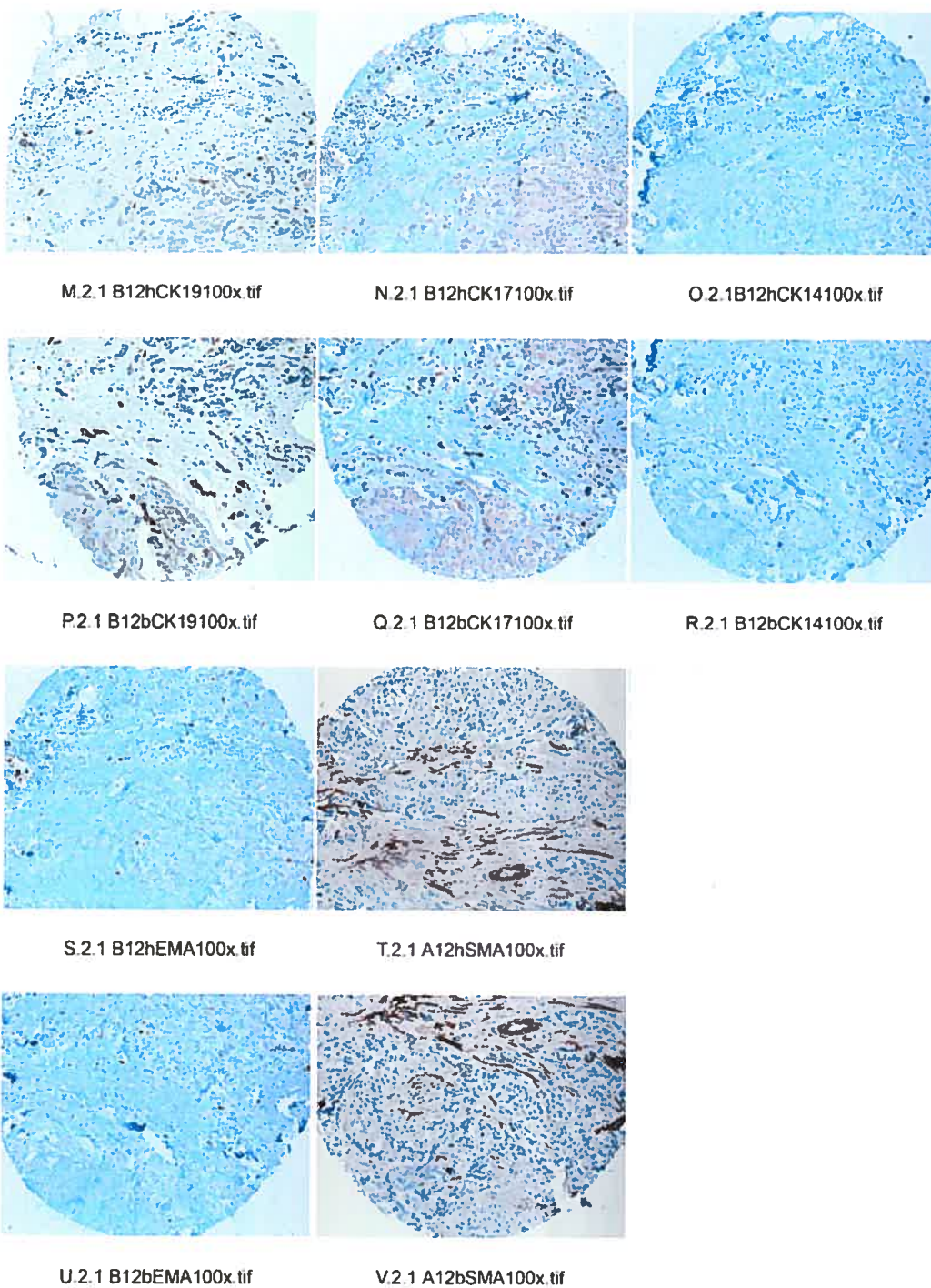
Figure 9 : Cas 12 (deuxième partie)

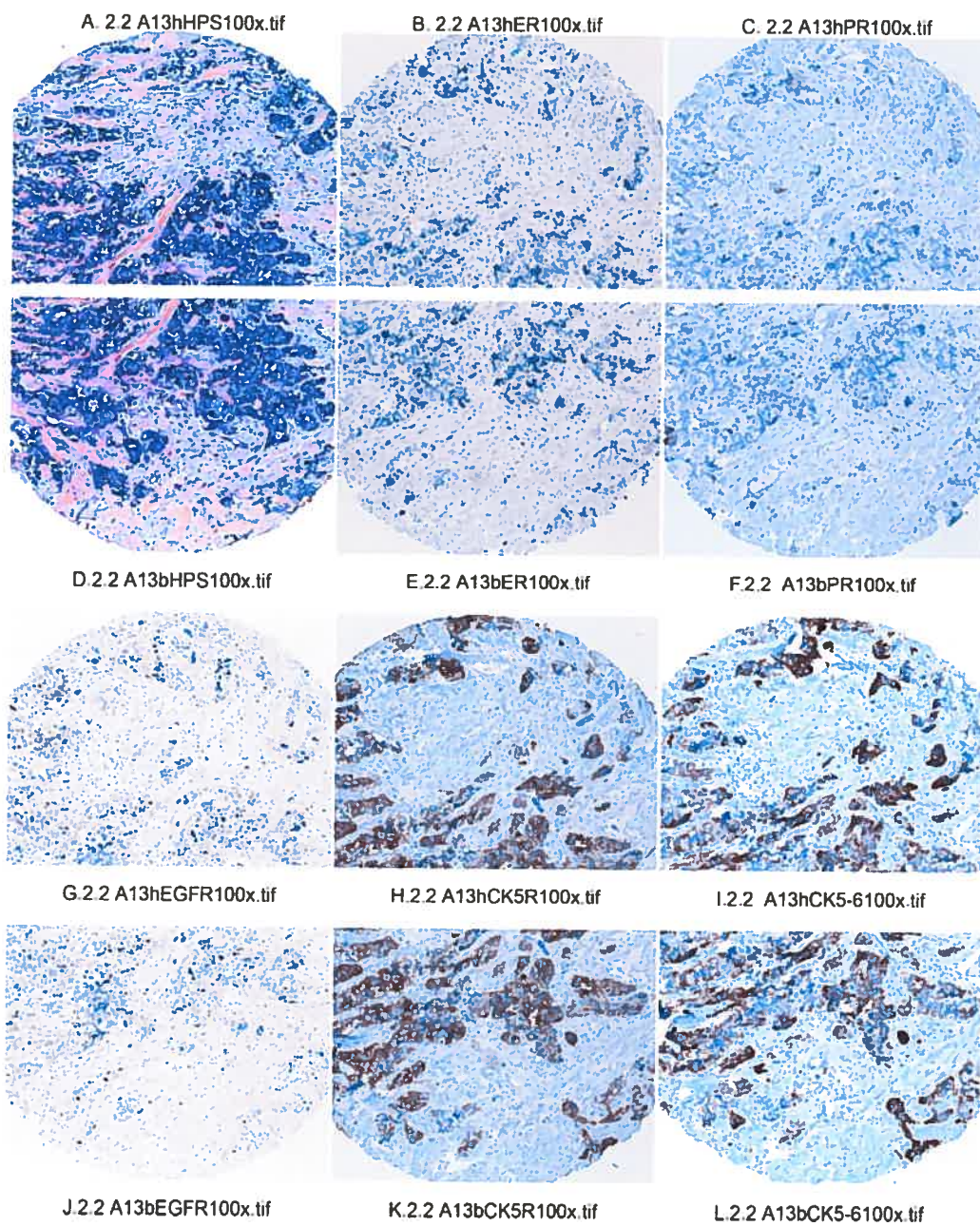
Figure 10 : Cas 13 (première partie)

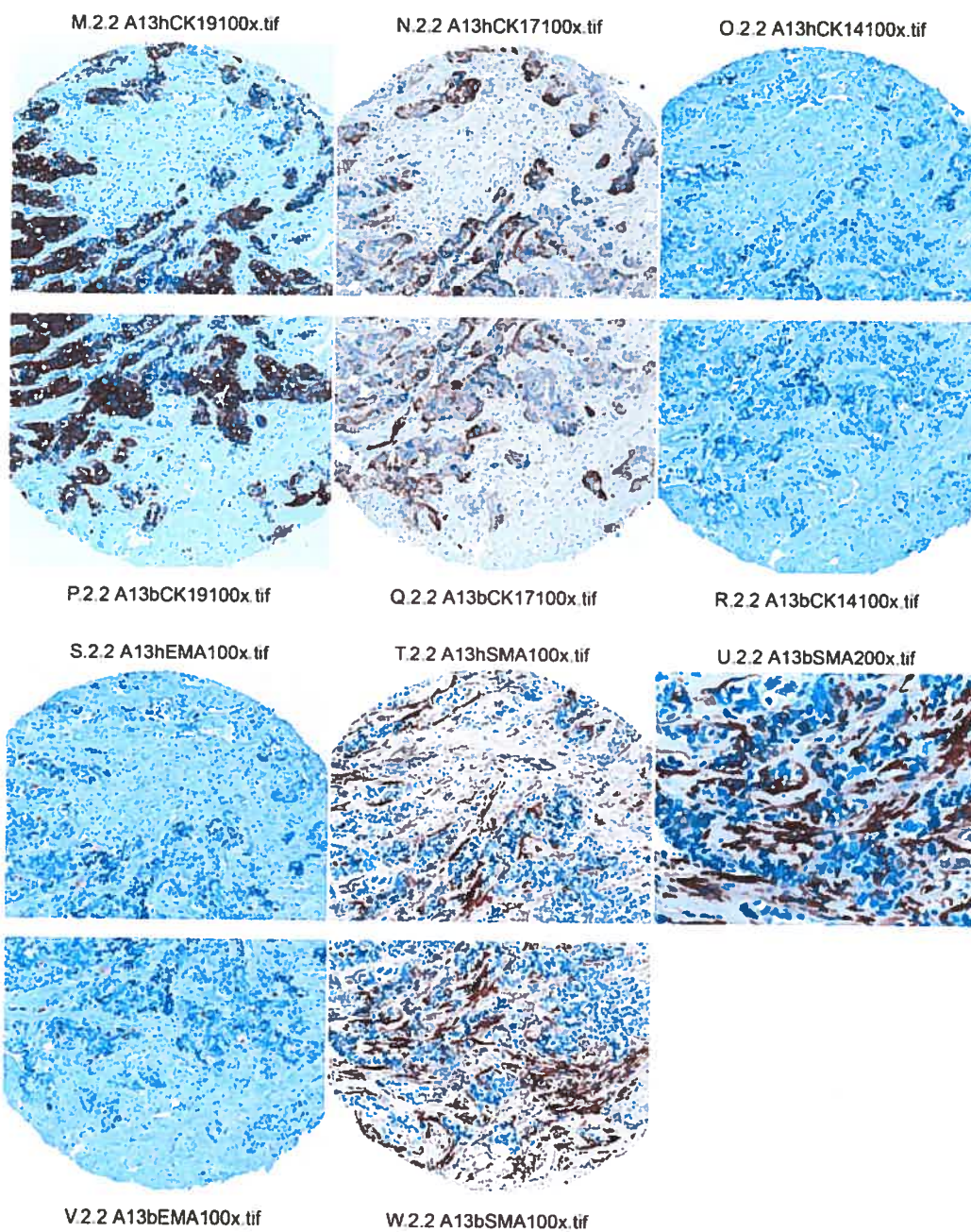
Figure 10 : Cas 13 (deuxième partie)

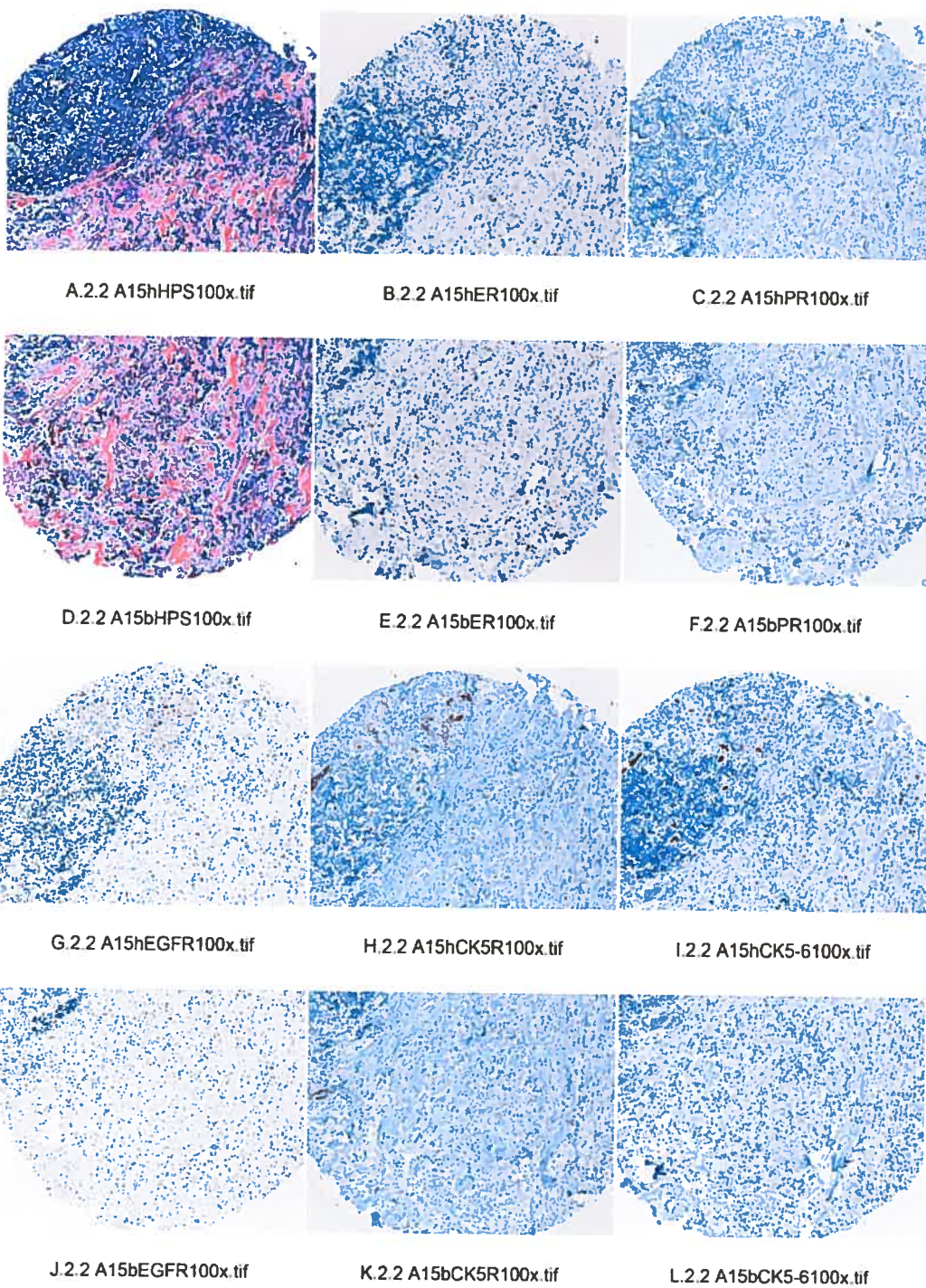
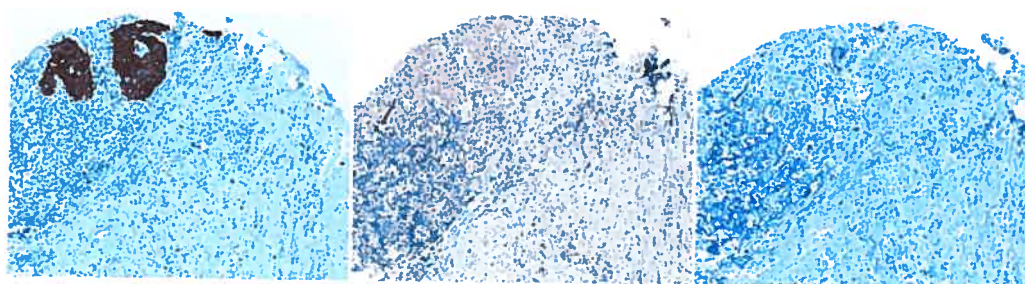
Figure 11 : Cas 15 (première partie)

Figure 11 : Cas 15 (deuxième partie)

M.2.2 A15hCK19100x.tif

N.2.2 A15hCK17100x.tif

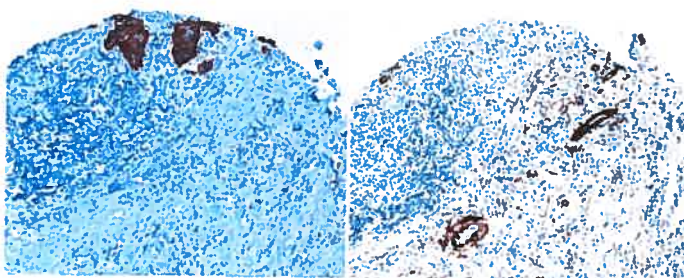
O.2.2 A15hCK14100x.tif



P.2.2 A15bCK19100x.tif

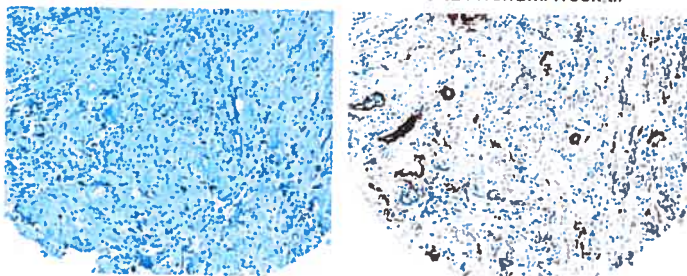
Q.2.2 A15bCK17100x.tif

R.2.2 A15bCK14100x.tif



S.2.2 A15hEMA100x.tif

T.2.2 A15hSMA100x.tif



U.2.2 A15bEMA100x.tif

V.2.2 A15bSMA100x.tif

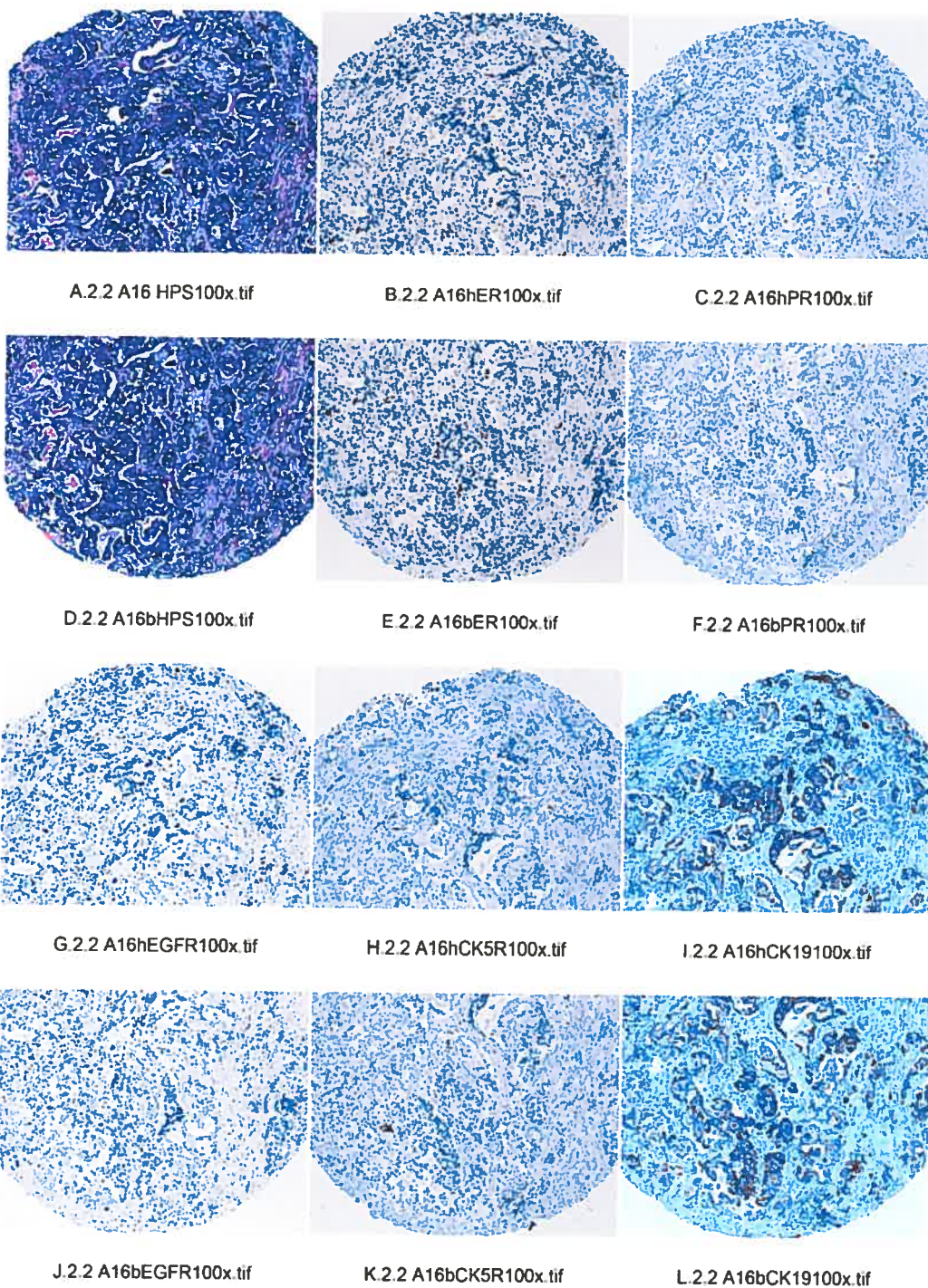
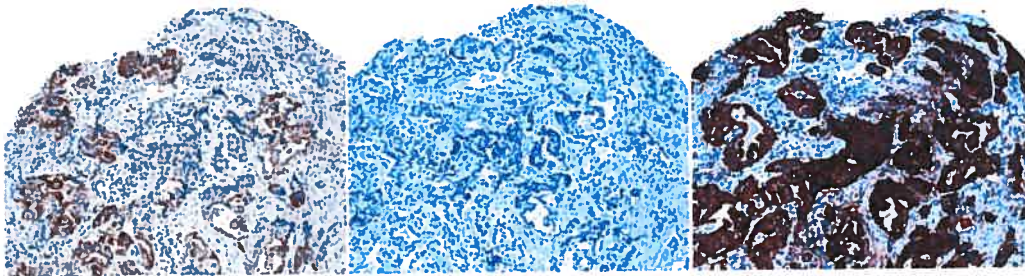
Figure 12 : Cas 16 (première partie)

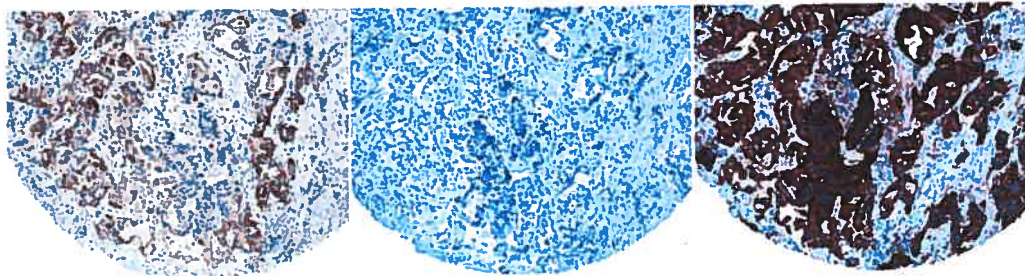
Figure 12 : Cas 16 (deuxième partie)



M.2.2 A16hCK17100x.tif

N.2.2 A16hCK14100x.tif

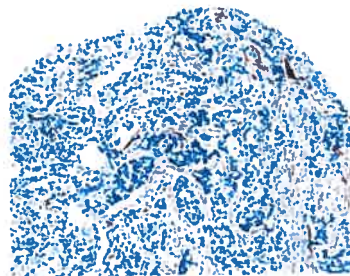
O.2.2 A16hEMA100x.tif



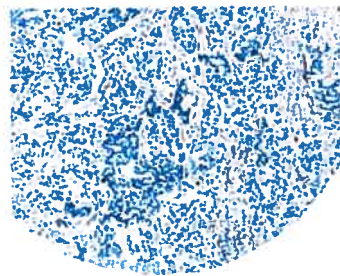
P.2.2 A16bCK17100x.tif

Q.2.2 A16bCK14100x.tif

R.2.2 A16bEMA100x.tif



S.2.2 A16hSMA100x.tif



T.2.2 A16bSMA100x.tif

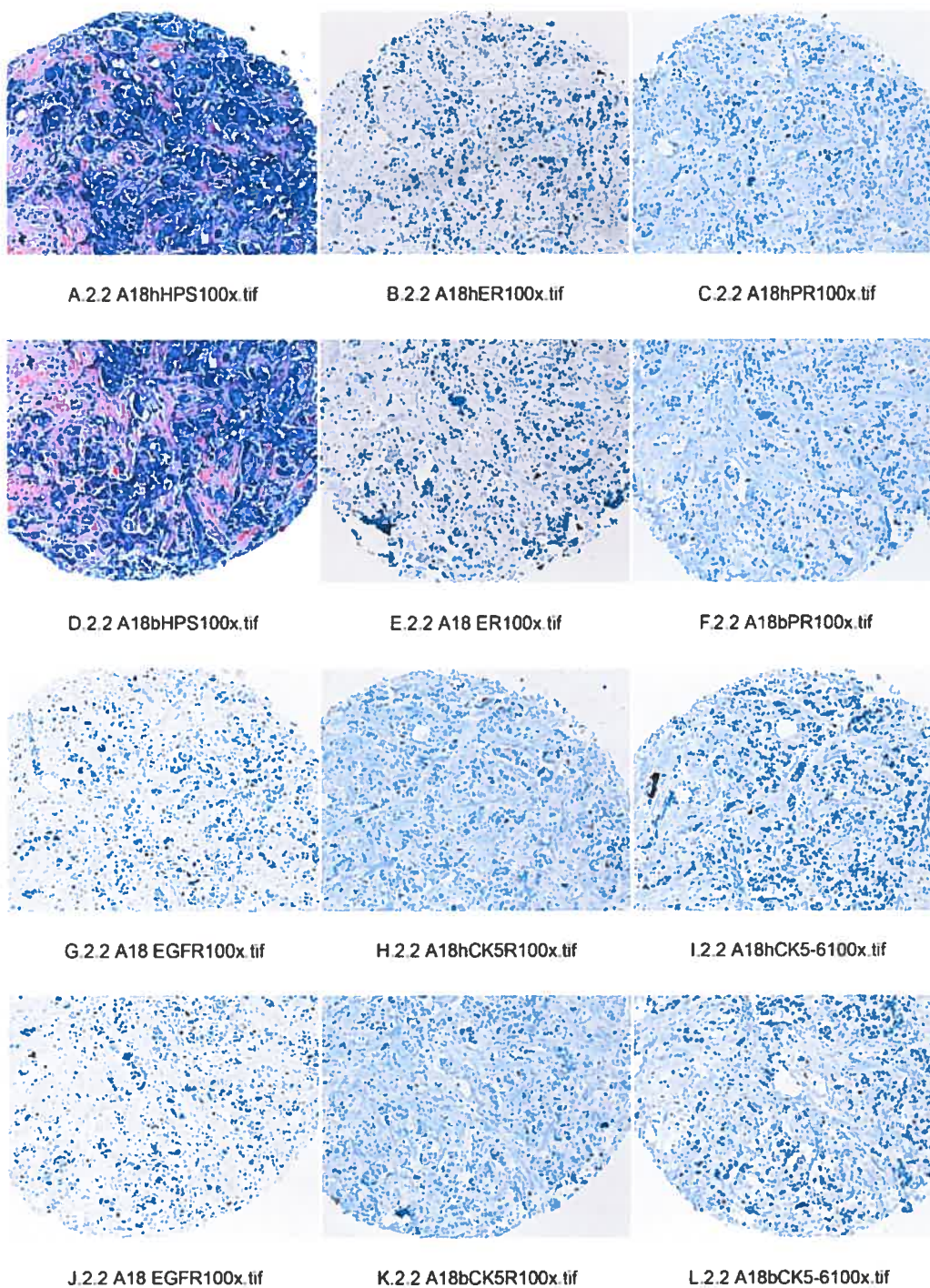
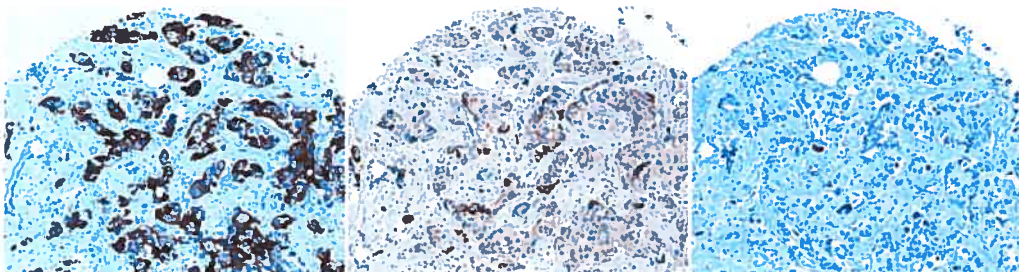
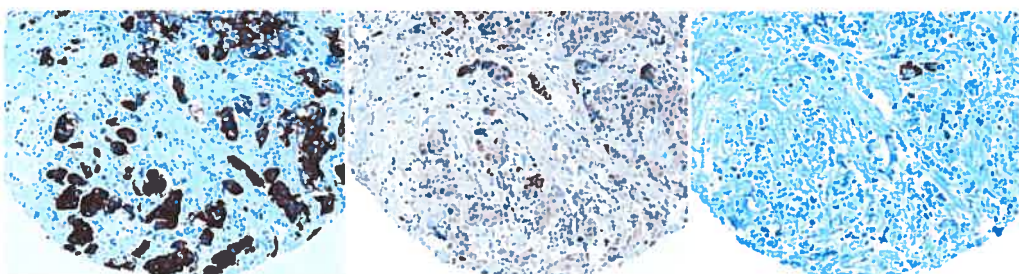
Figure 13 : Cas 18 (première partie)

Figure 13 : Cas 18 (deuxième partie)

M.2.2 A18hCK19100x.tif

N.2.2 A18hCK17100x.tif

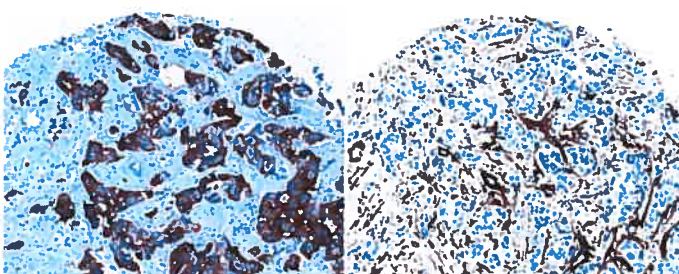
O.2.2 A18 CK14100x.tif



P.2.2 A18bCK19100x.tif

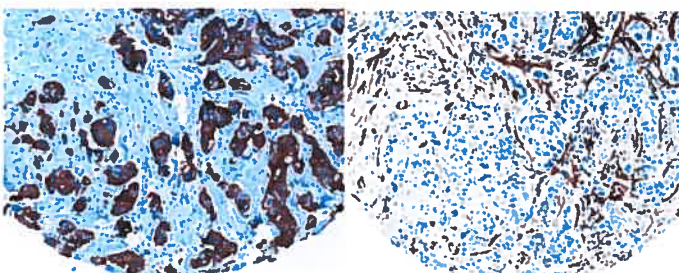
Q.2.2 A18bCK17100x.tif

R.2.2 A18bCK14100x.tif



S.2.2 A18hEMA100x.tif

T.2.2 A18hSMA100x.tif



U.2.2 A18bEMA100x.tif

V.2.2 A18bSMA100x.tif

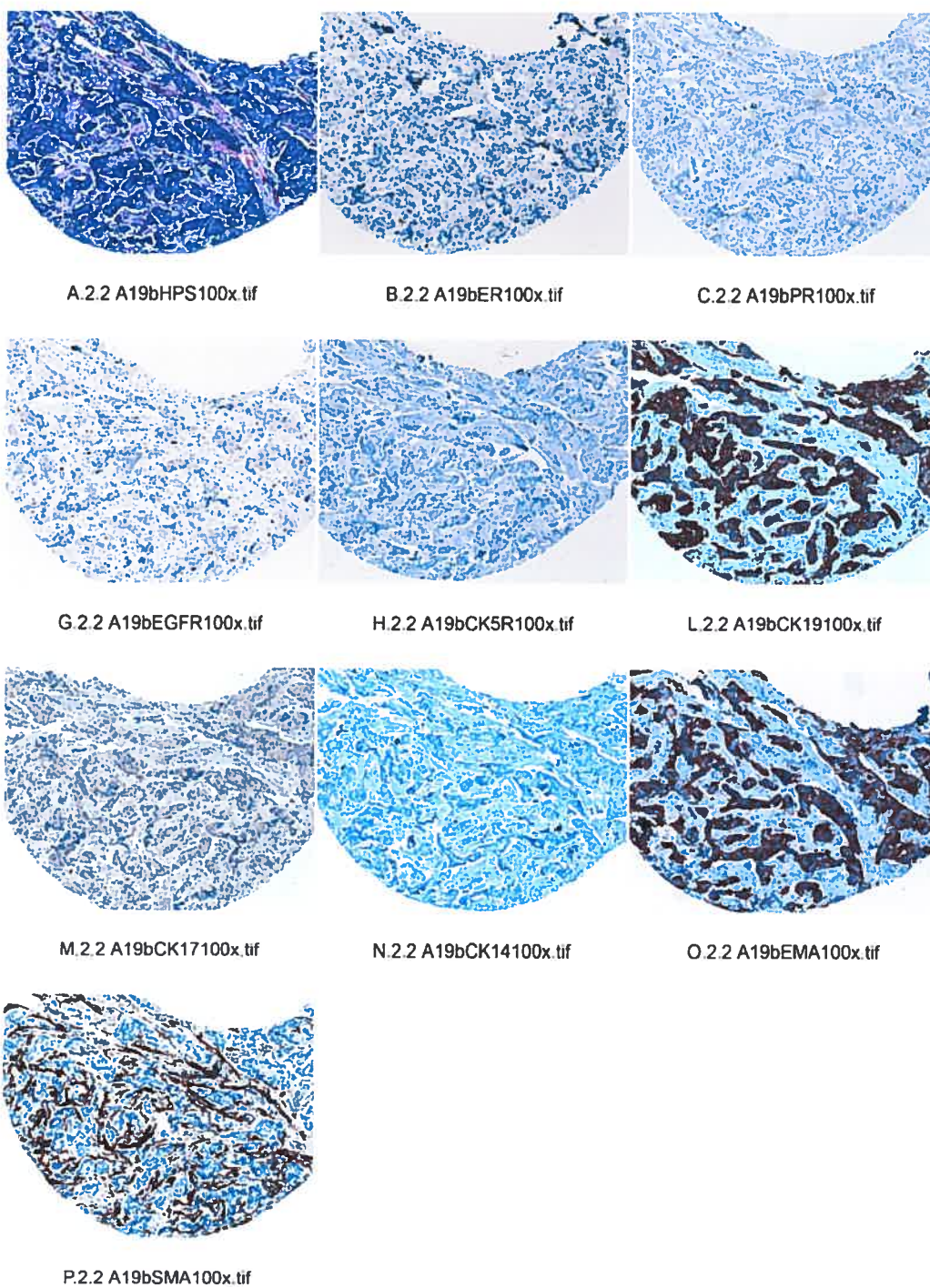
Figure 14 : Cas 19

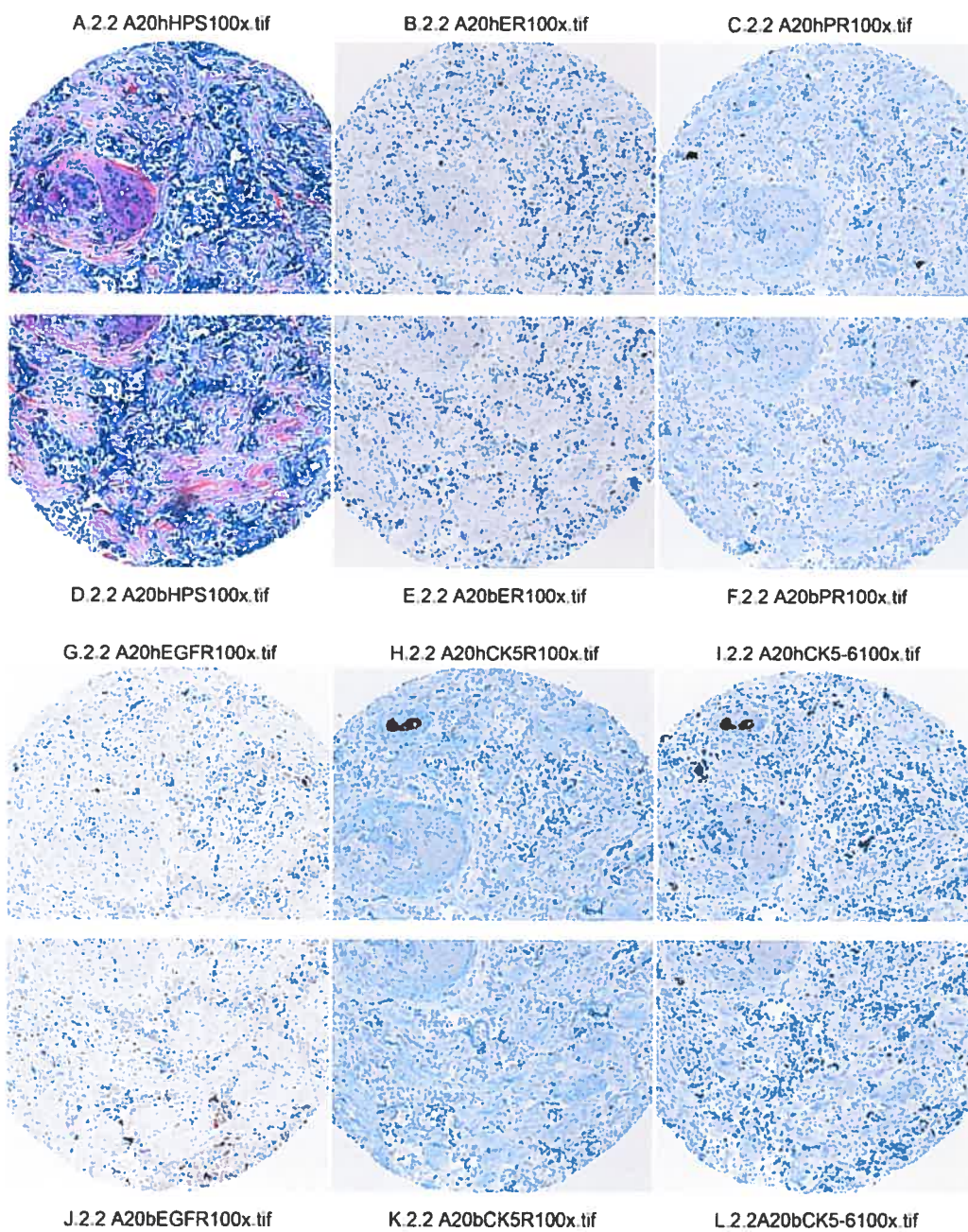
Figure 15 : Cas 20 (première partie)

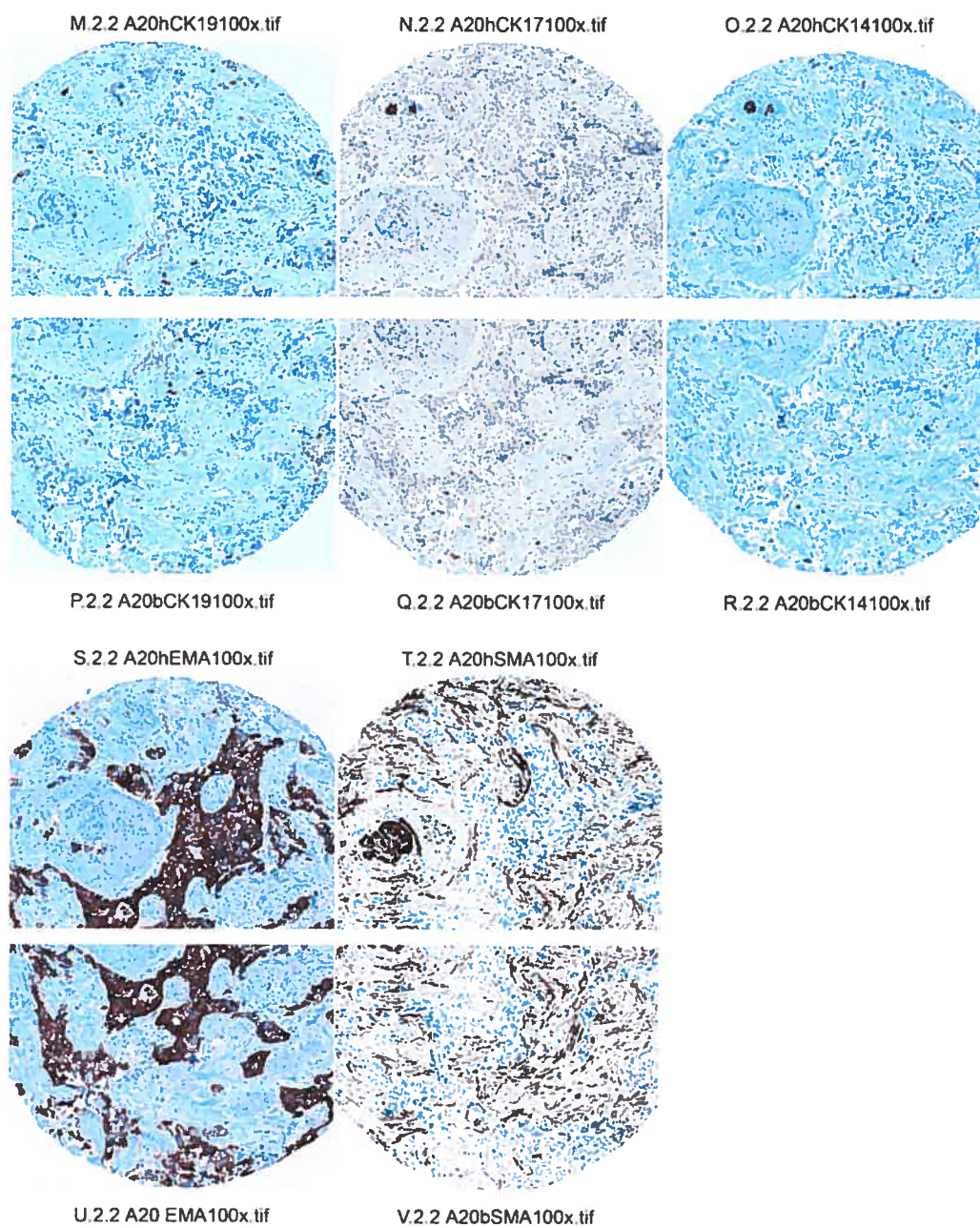
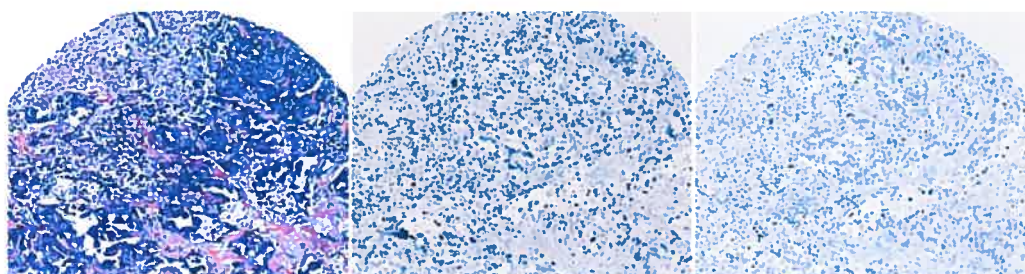
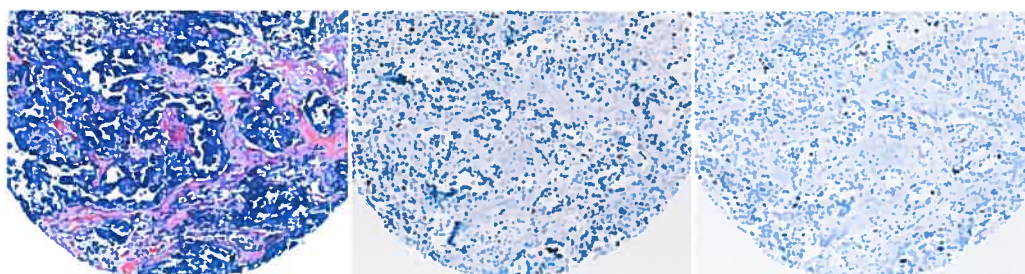
Figure 15 : Cas 20 (deuxième partie)

Figure 16 : Cas 21 (première partie)

A.2.2 B21hHPS100x.tif

B.2.2 B21hER100x.tif

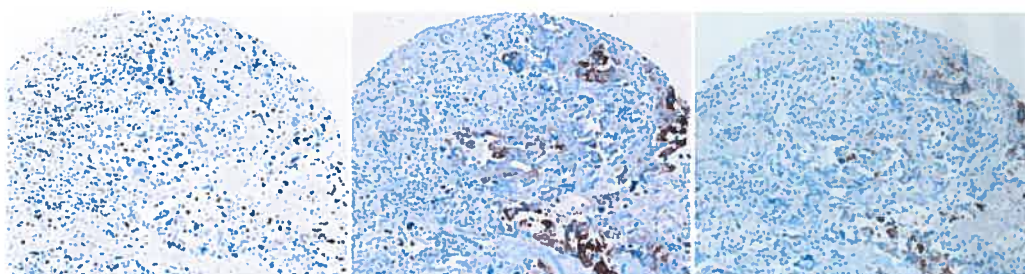
C.2.2 B21hPR100x.tif



D.2.2 B21bHPS100x.tif

E.2.2 B21bER100x.tif

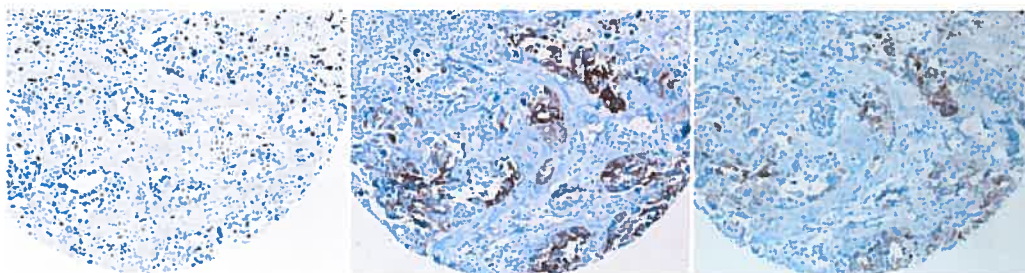
F.2.2 B21bPR100x.tif



G.2.2 B21hEGFR100x.tif

H.2.2 B21hCK5R100x.tif

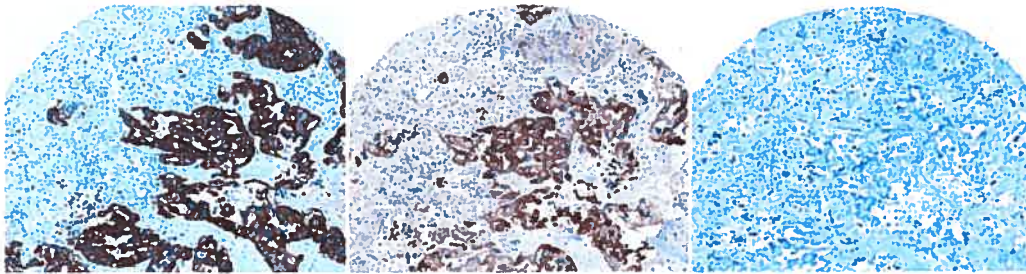
I.2.2 B21hCK5-6 100x.tif



J.2.2 B21 EGFR100x.tif

K.2.2 B21bCK5R100x.tif

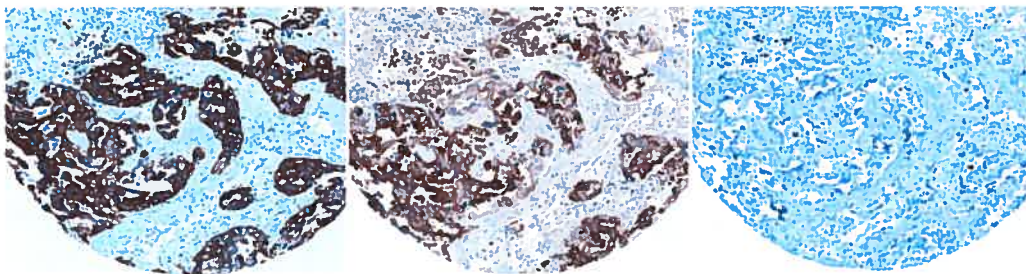
L.2.2 B21bCK5-6 100x.tif

Figure 16 : Cas 21 (deuxième partie)

M.2.2 B21hCK19100x.tif

N.2.2 B21hCK17100x.tif

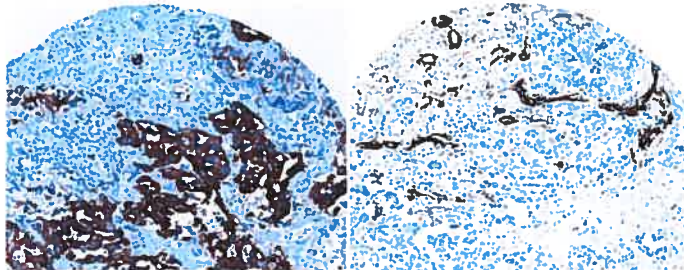
O.2.2 B21 CK14100x.tif



P.2.2 B21bCK19100x.tif

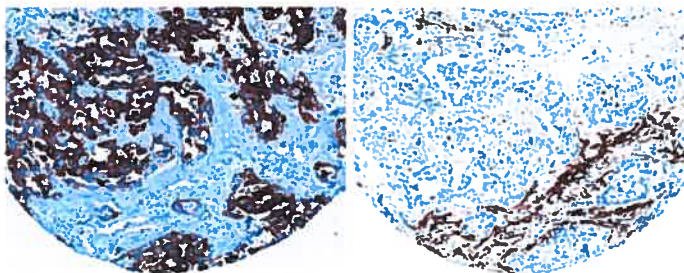
Q.2.2 B21bCK17100x.tif

R.2.2 B21bCK14100x.tif



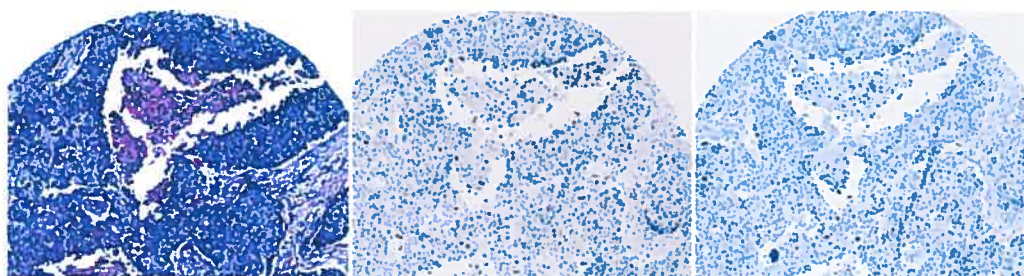
S.2.2 B21hEMA100x.tif

T.2.2 B21hSMA100x.tif



U.2.2 B21bEMA100x.tif

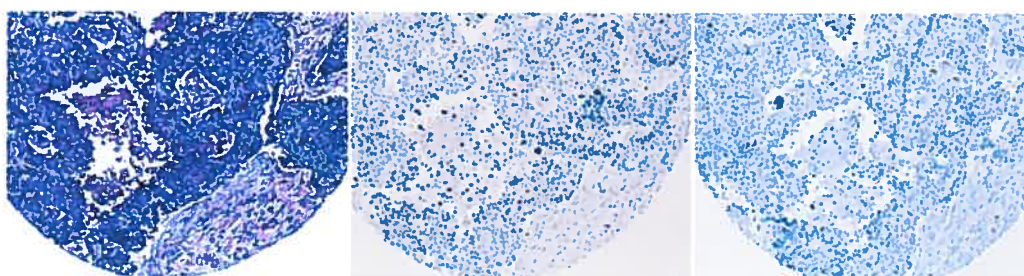
V.2.2 B21bSMA100x.tif

Figure 17 : Cas 23 (première partie)

A.2.2 A23hHPS100x.tif

B.2.2 A23hER100x.tif

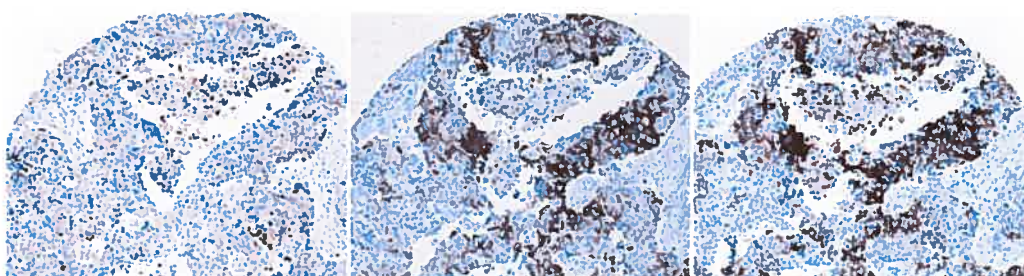
C.2.2 A23hPR100x.tif



D.2.2 A23bHPS100x.tif

E.2.2 A23bER100x.tif

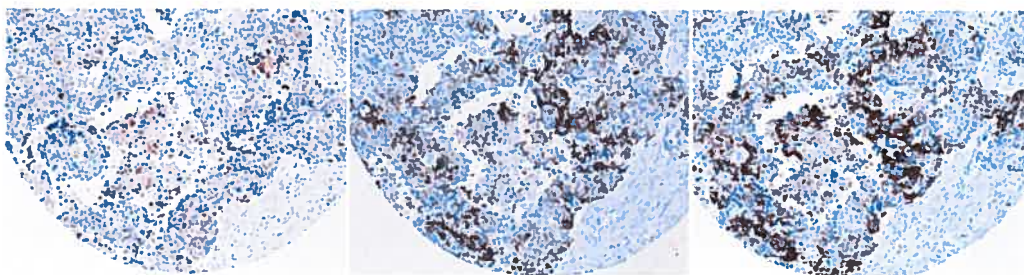
F.2.2 A23bPR100x.tif



G.2.2 A23hEGFR100x.tif

H.2.2 A23hCK5R100x.tif

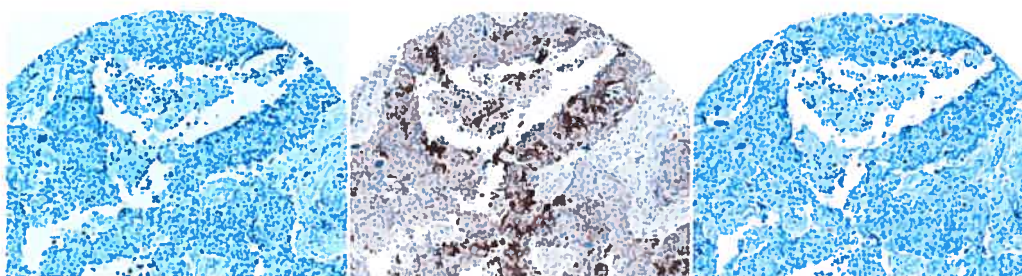
I.2.2 A23hCK5-6100x.tif



J.2.2 A23bEGFR100x.tif

K.2.2 A23bCK5R100x.tif

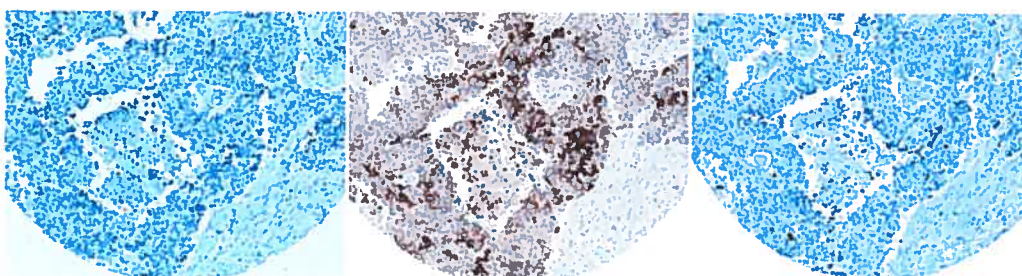
L.2.2 A23bCK5-6100x.tif

Figure 17 : Cas 23 (deuxième partie)

M.2.2 A23hCK19100x.tif

N.2.2 A23hCK17100x.tif

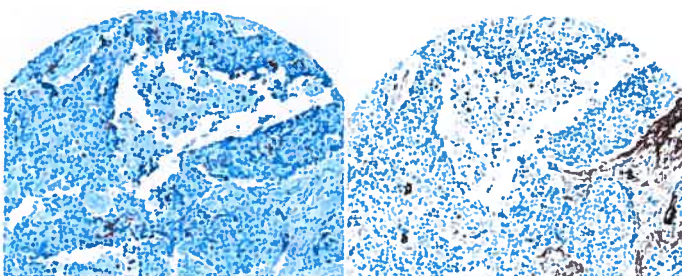
O.2.2 A23hCK14100x.tif



P.2.2 A23bCK19100x.tif

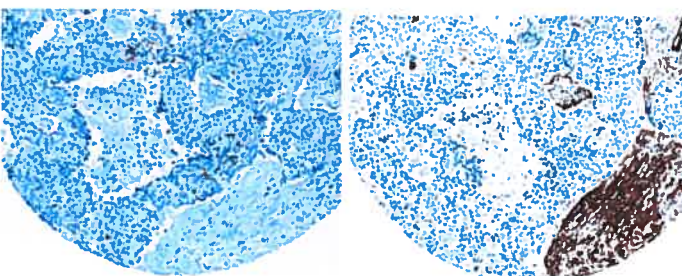
Q.2.2 A23bCK17100x.tif

R.2.2 A23bCK14100x.tif



S.2.2 A23hEMA100x.tif

T.2.2 A23hSMA100x.tif



U.2.2 A23bEMA100x.tif

V.2.2 A23bSMA100x.tif

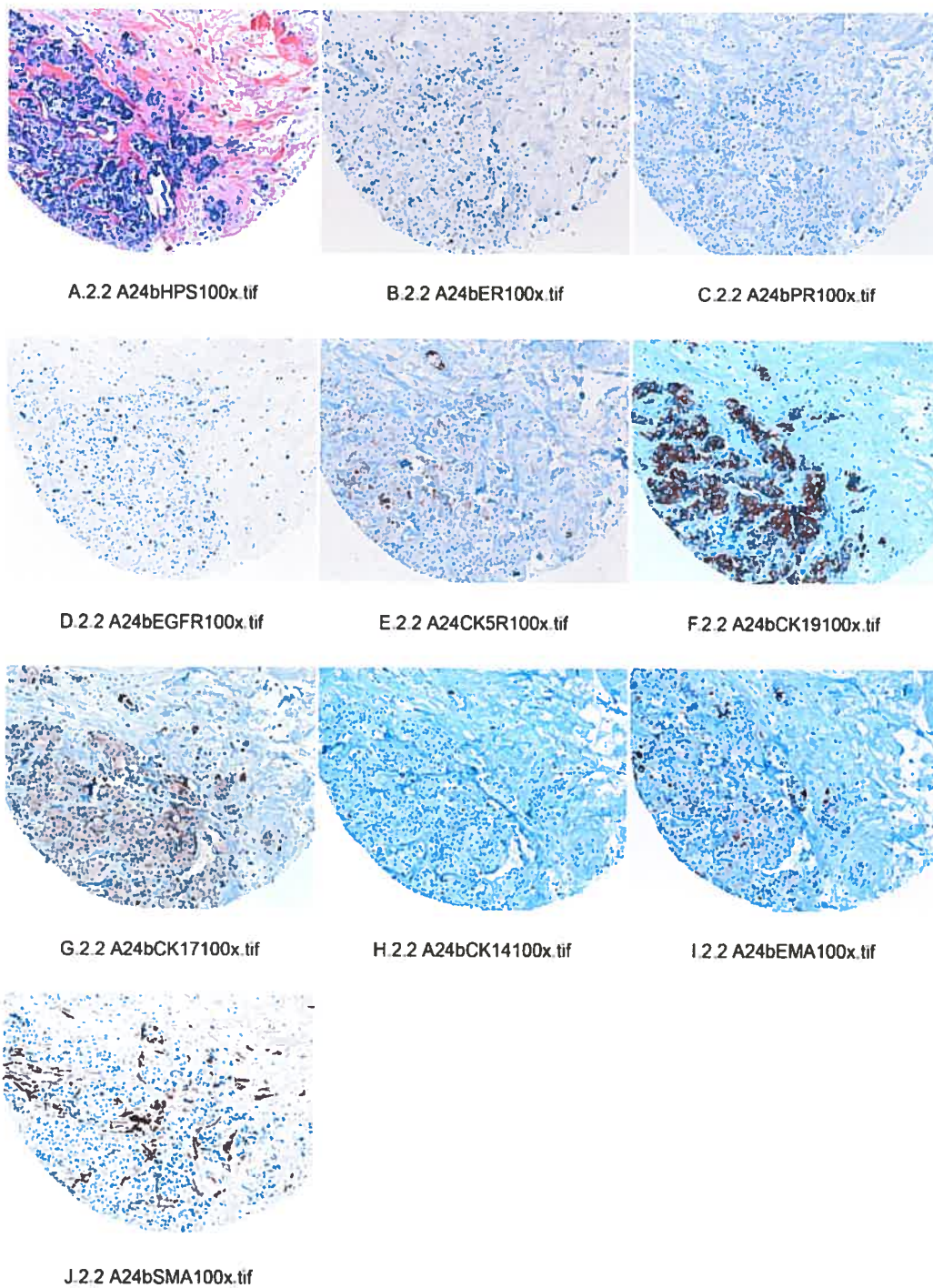
Figure 18 : Cas 24

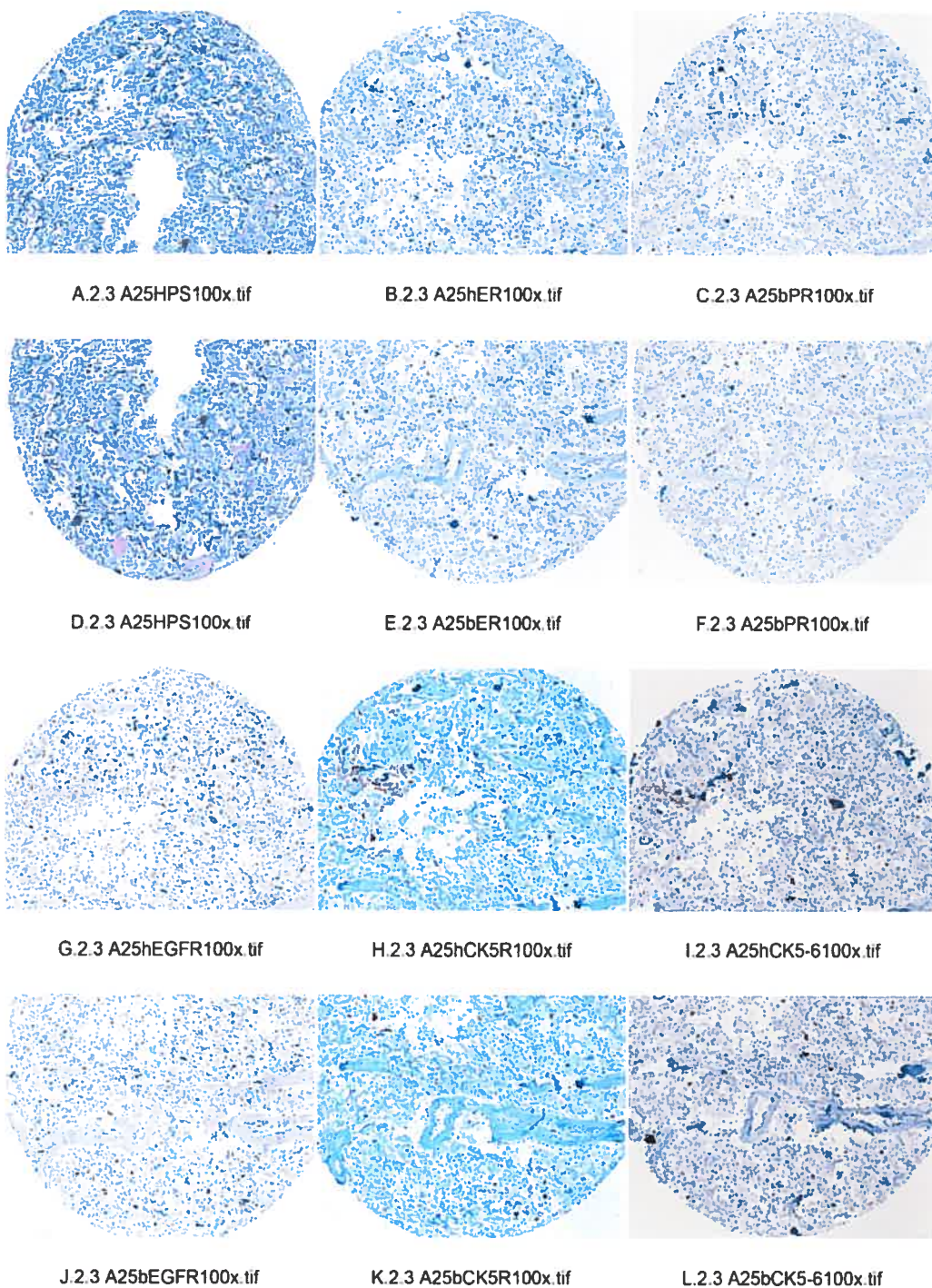
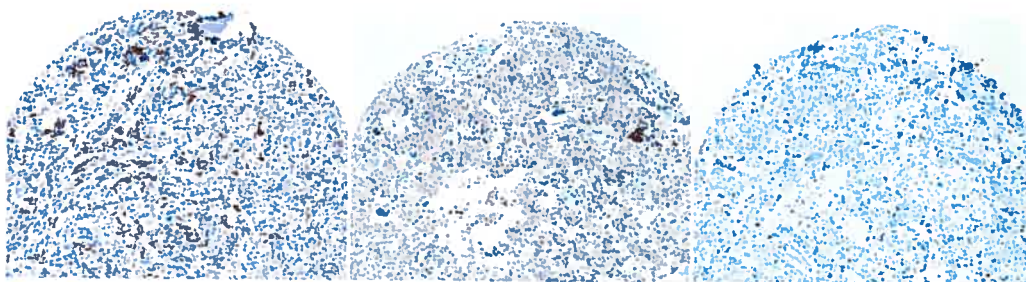
Figure 19 : Cas 25 (première partie)

Figure 19 : Cas 25 (deuxième partie)

M.2.3 B25hCK19100x.tif

N.2.3 A25hCK17100x.tif

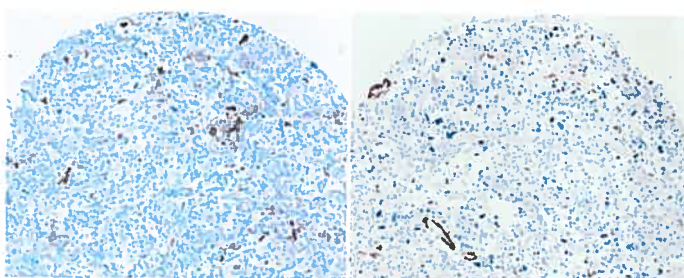
O.2.3 A25hCK14100x.tif



P.2.3 B25bCK19100x.tif

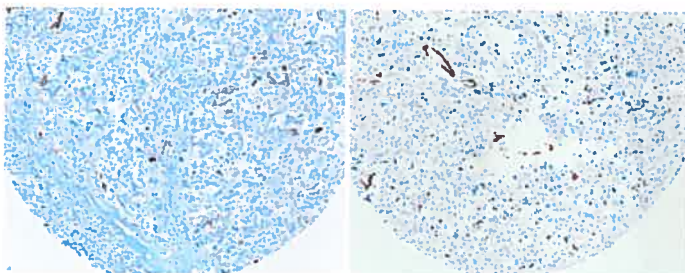
Q.2.3 A25bCK17100x.tif

R.2.3 A25bCK14100x.tif



S.2.3 D25hEMA100x.tif

T.2.3 A25hSMA100x.tif



U.2.3 D25bEMA100x.tif

V.2.3 A25bSMA100x.tif

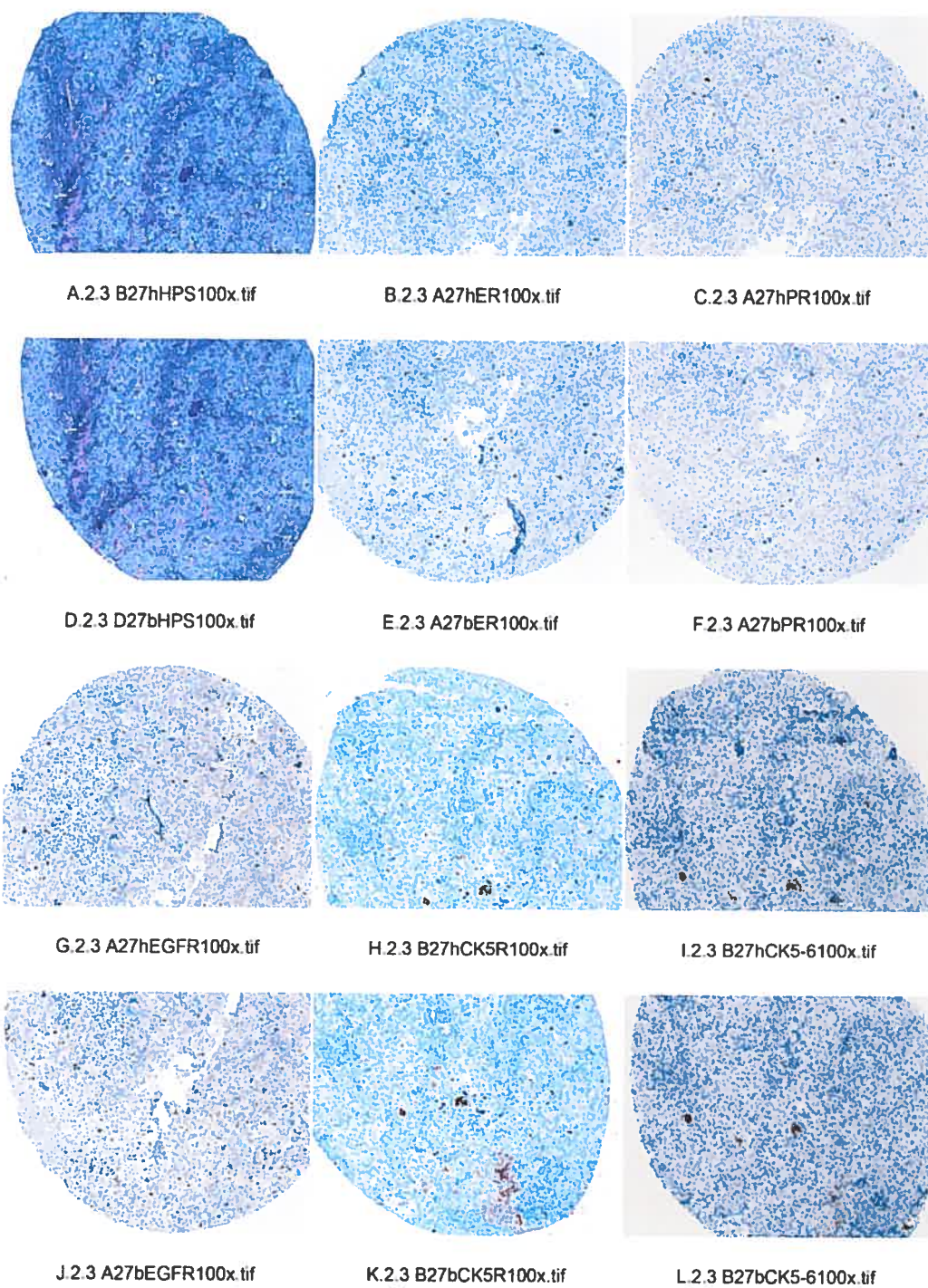
Figure 20 : Cas 27 (première partie)

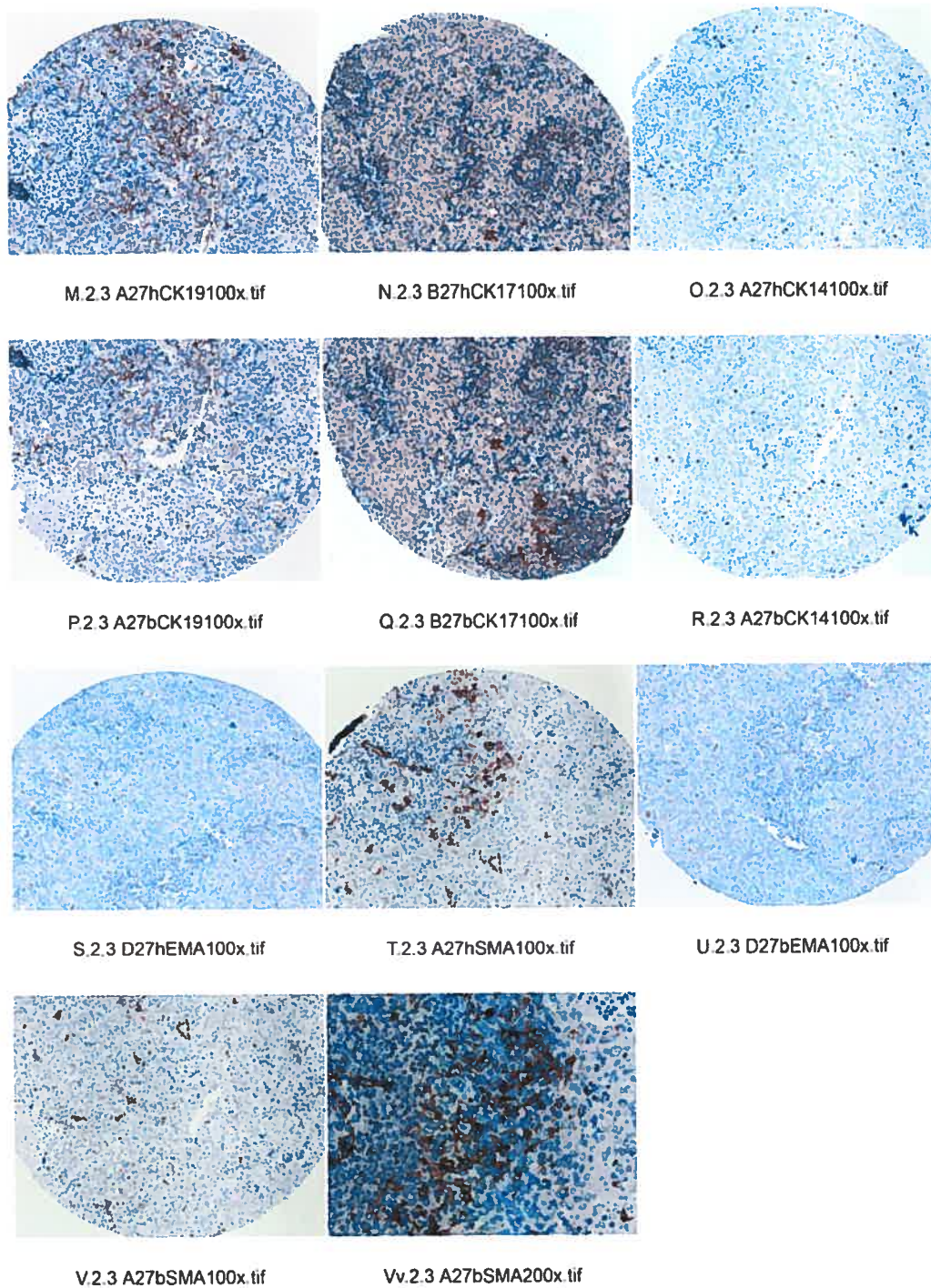
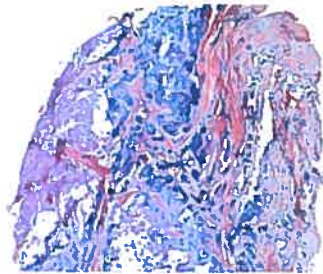
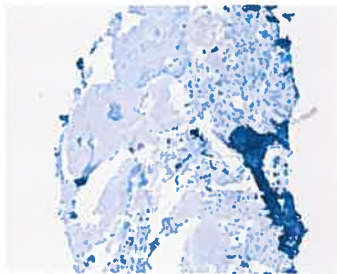
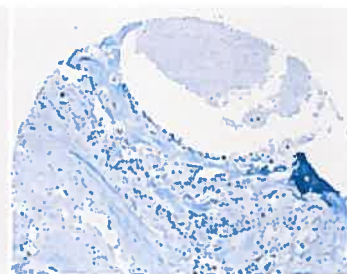
Figure 20 : Cas 27 (deuxième partie)

Figure 21 : Cas 28

A.2.3 B28hHPS100x.tif



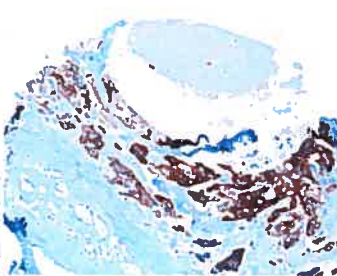
B.2.3 D28ER100x.tif



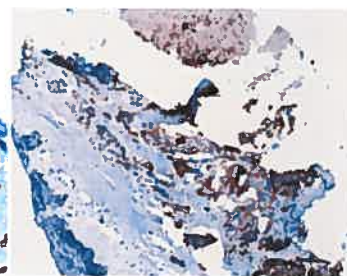
C.2.3 D28hPR100x.tif



G.2.3 D28hEGFR100x.tif



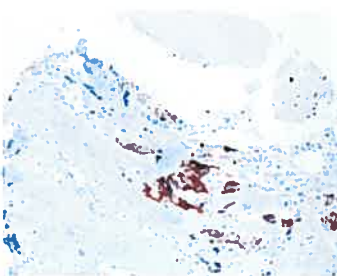
H.2.3 D28hCK5R100x.tif



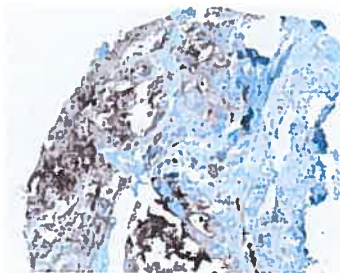
I.2.3 D28CK5-6100x.tif



M.2.3 B28hCK19100x.tif



O.2.3 D28hCK14100x.tif



S.2.3 B28hEMA100x.tif



T.2.3 A28hSMA100x.tif

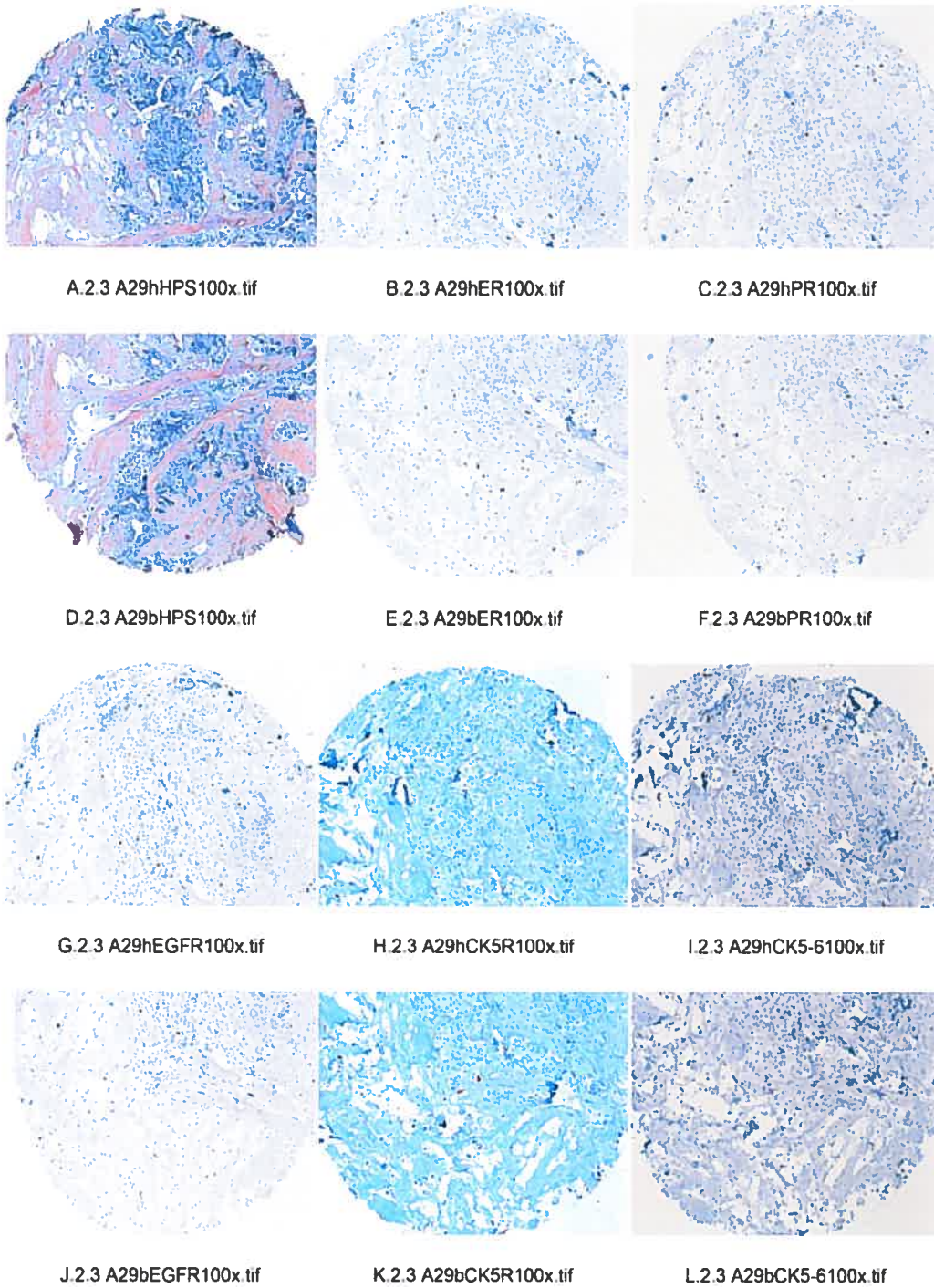
Figure 22 : Cas 29 (première partie)

Figure 22 : Cas 29 (deuxième partie)

M.2.3 A29hCK19100x.tif

N.2.3 A29hCK17100x.tif

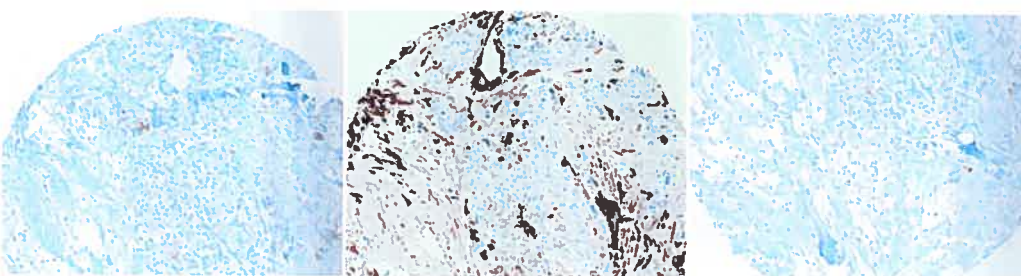
O.2.3 A29hCK14100x.tif



P.2.3 A29bCK19100x.tif

Q.2.3 A29bCK17100x.tif

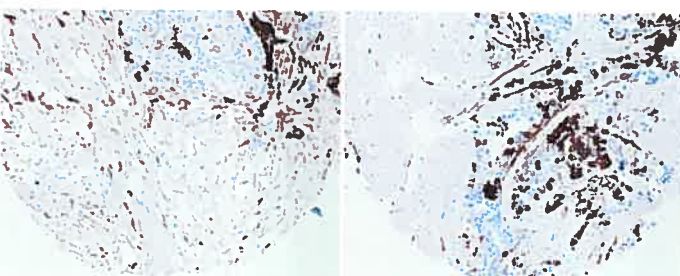
R.2.3 A29bCK14100x.tif



S.2.3 A29hEMA100x.tif

T.2.3 A29hSMA100x.tif

U.2.3 A29bEMA100x.tif



V.2.3 A29bSMA100x.tif

V.2.3 B29bSMA100x.tif

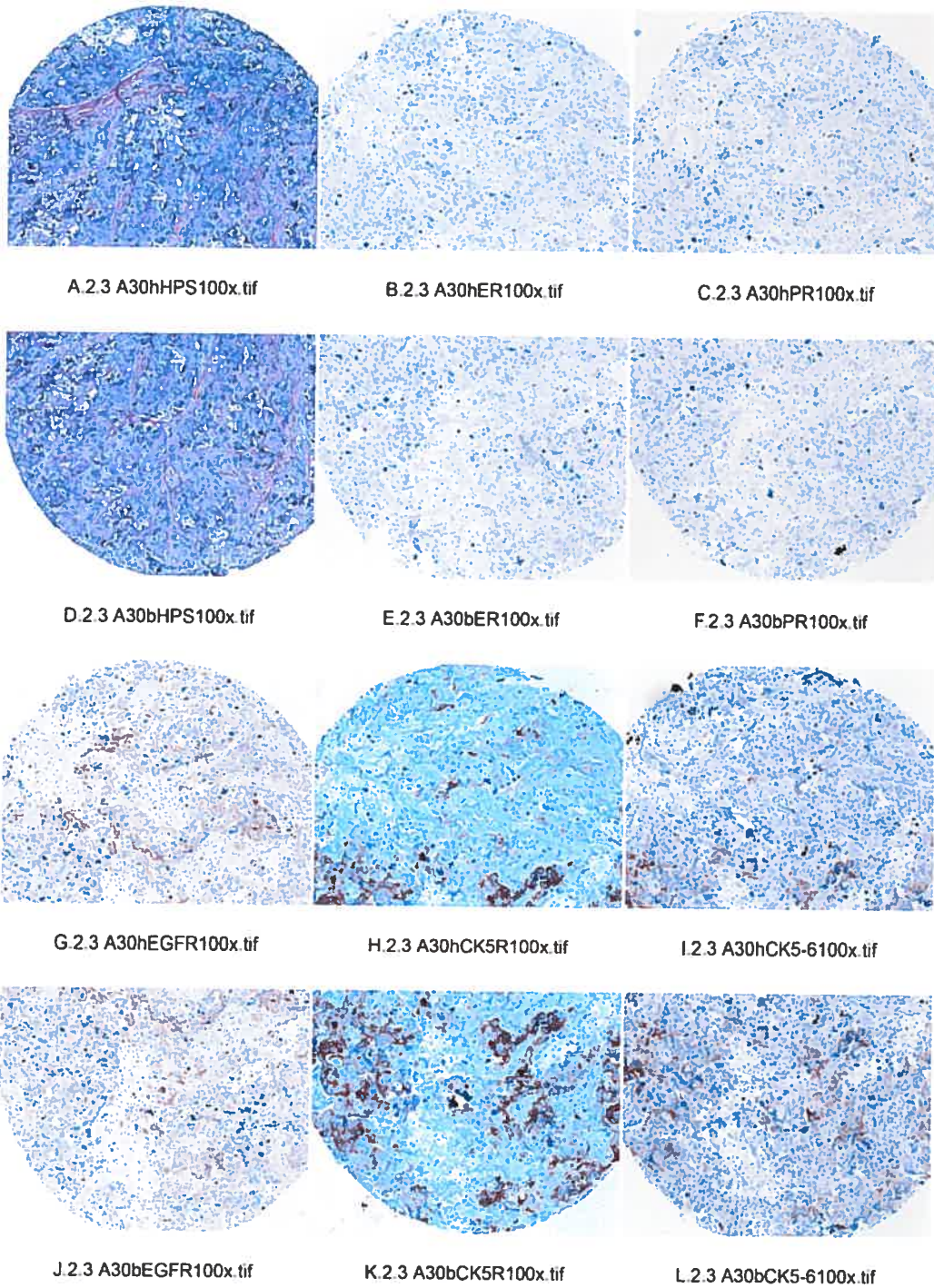
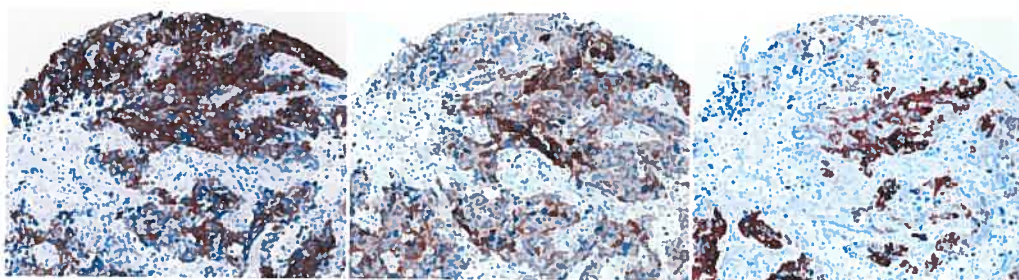
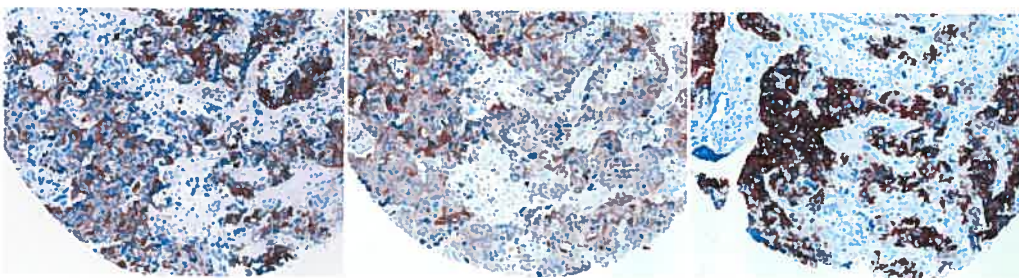
Figure 23: Cas 30 (première partie)

Figure 23 : Cas 30 (deuxième partie)

M.2.3 A30hCK19100x.tif

N.2.3 A30hCK17100x.tif

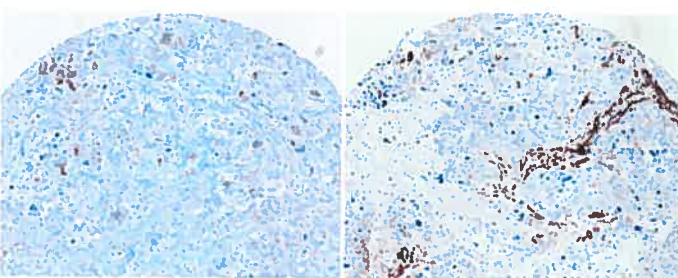
O.2.3 A30hCK14100x.tif



P.2.3 A30bCK19100x.tif

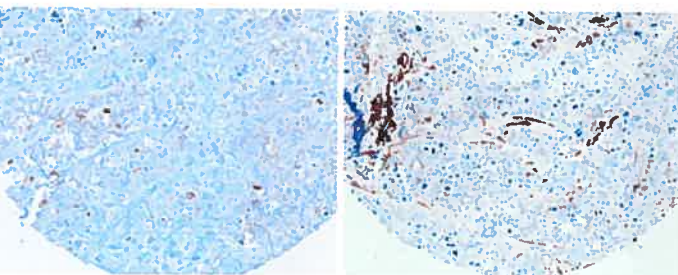
Q.2.3 A30bCK17100x.tif

R.2.3 A30bCK14100x.tif



S.2.3 D30hEMA100x.tif

T.2.3 A30hSMA100x.tif



U.2.3 D30bEMA100x.tif

V.2.3 A30bSMA100x.tif

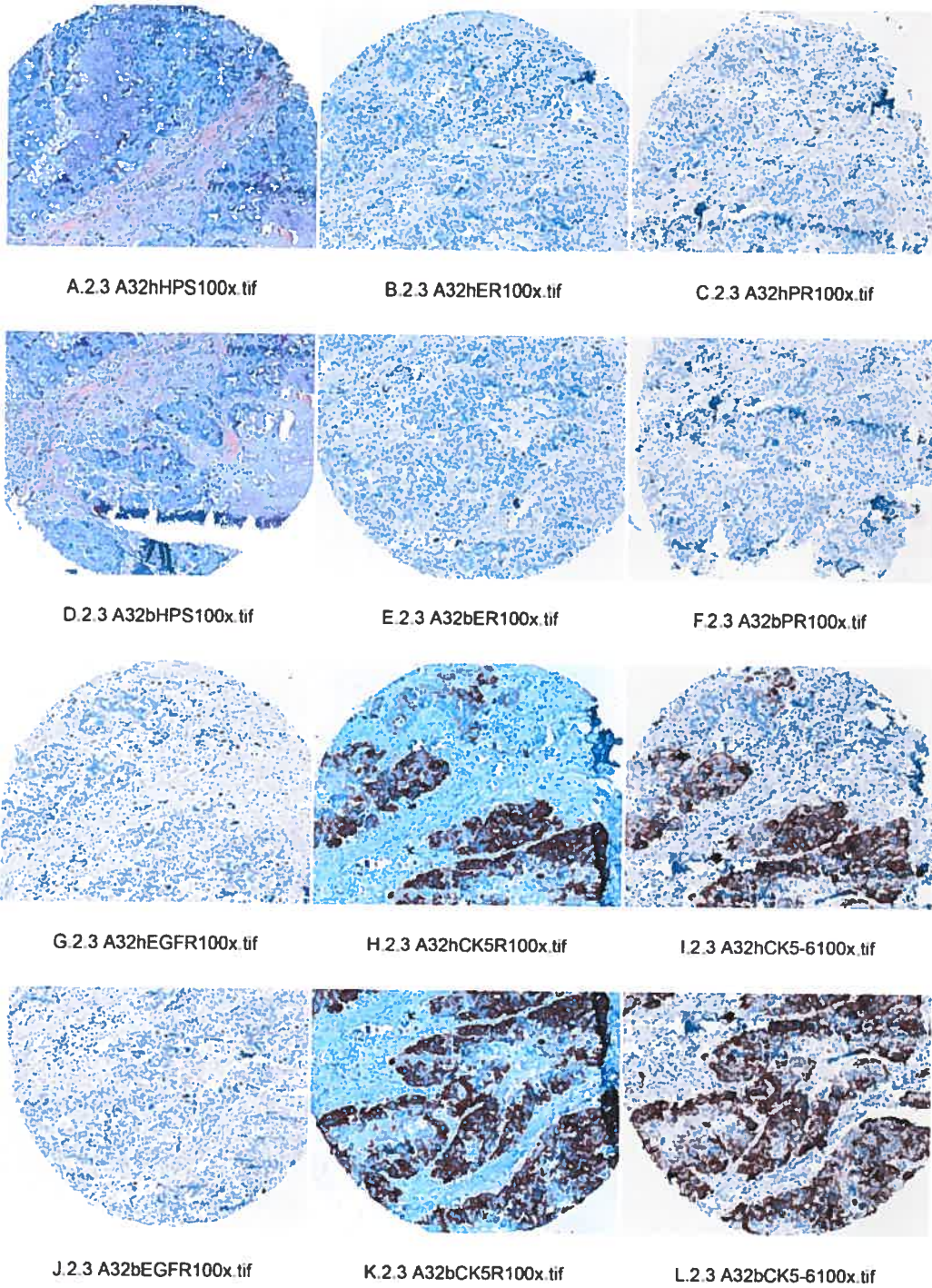
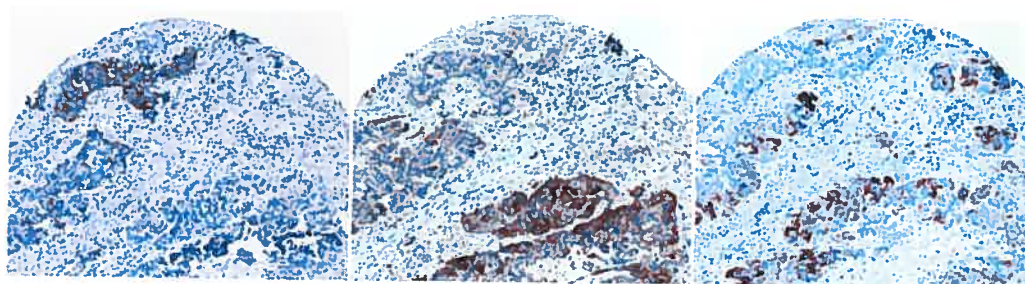
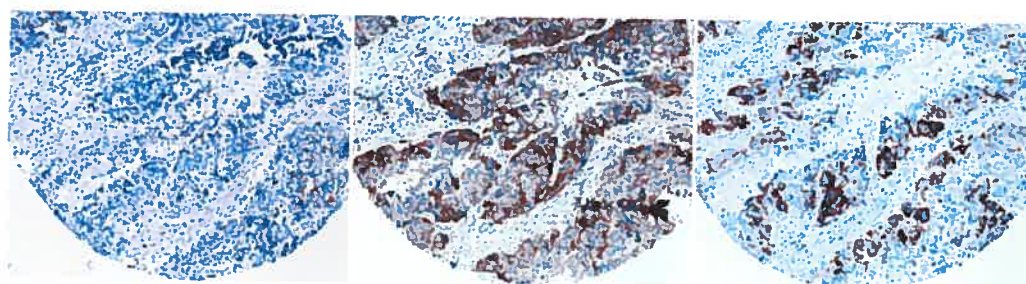
Figure 24 : Cas 32 (première partie)

Figure 24 : Cas 32 (deuxième partie)

M.2.3 A32hCK19100x.tif

N.2.3 A32hCK17100x.tif

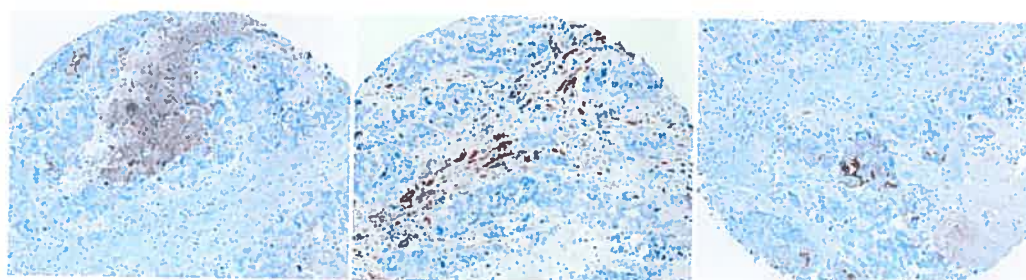
O.2.3 A32hCK14100x.tif



P.2.3 A32bCK19100x.tif

Q.2.3 A32bCK17100x.tif

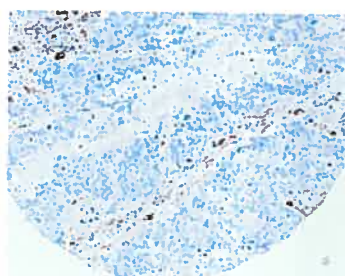
R.2.3 A32bCK14100x.tif



S.2.3 B32hEMA100x.tif

T.2.3 A32hSMA100x.tif

U.2.3 B32bEMA100x.tif



V.2.3 A32bSMA100x.tif

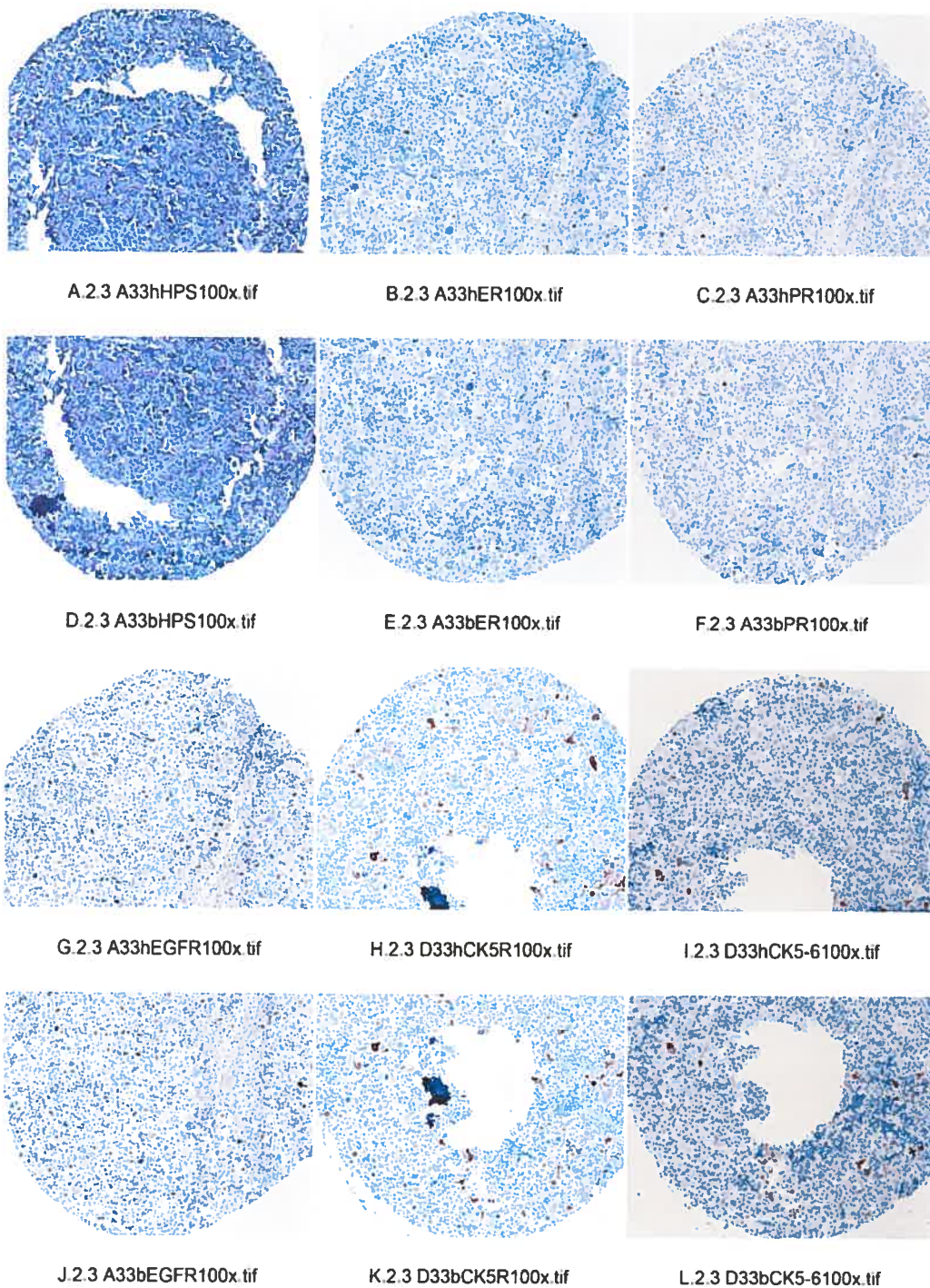
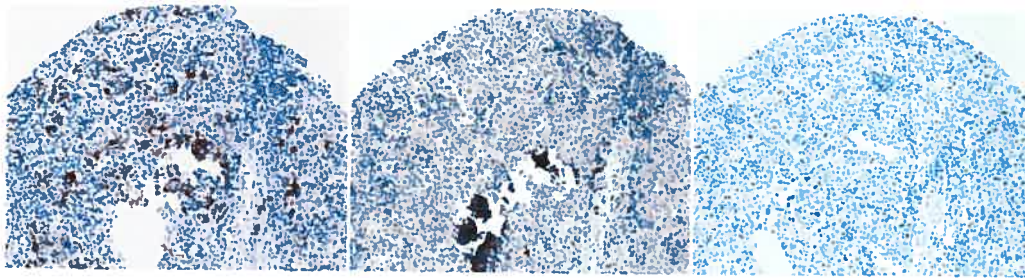
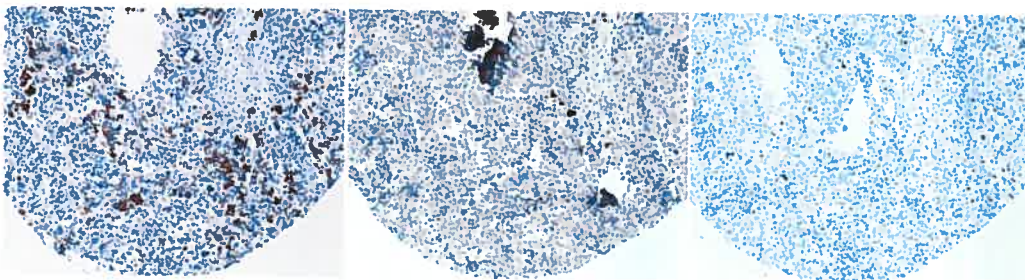
Figure 25 : Cas 33 (première partie)

Figure 25 : Cas 33 (deuxième partie)

M.2.3 A33hCK19100x.tif

N.2.3 A33hCK17100x.tif

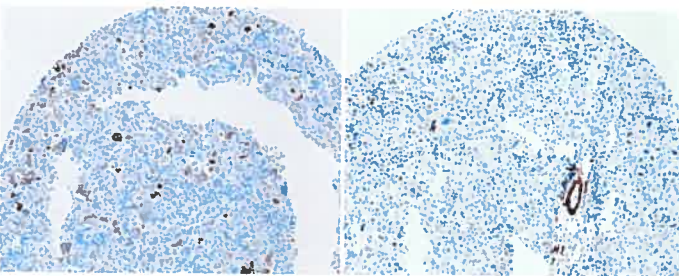
O.2.3 A33hCK14100x.tif



P.2.3 A33bCK19100x.tif

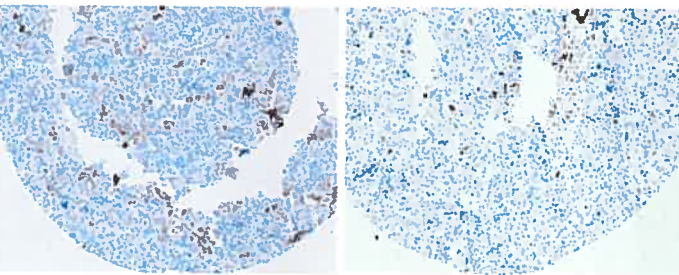
Q.2.3 A33bCK17100x.tif

R.2.3 A33bCK14100x.tif



S.2.3 A33hEMA100x.tif

T.2.3 A33hSMA100x.tif



U.2.3 A33bEMA100x.tif

V.2.3 A33bSMA100x.tif

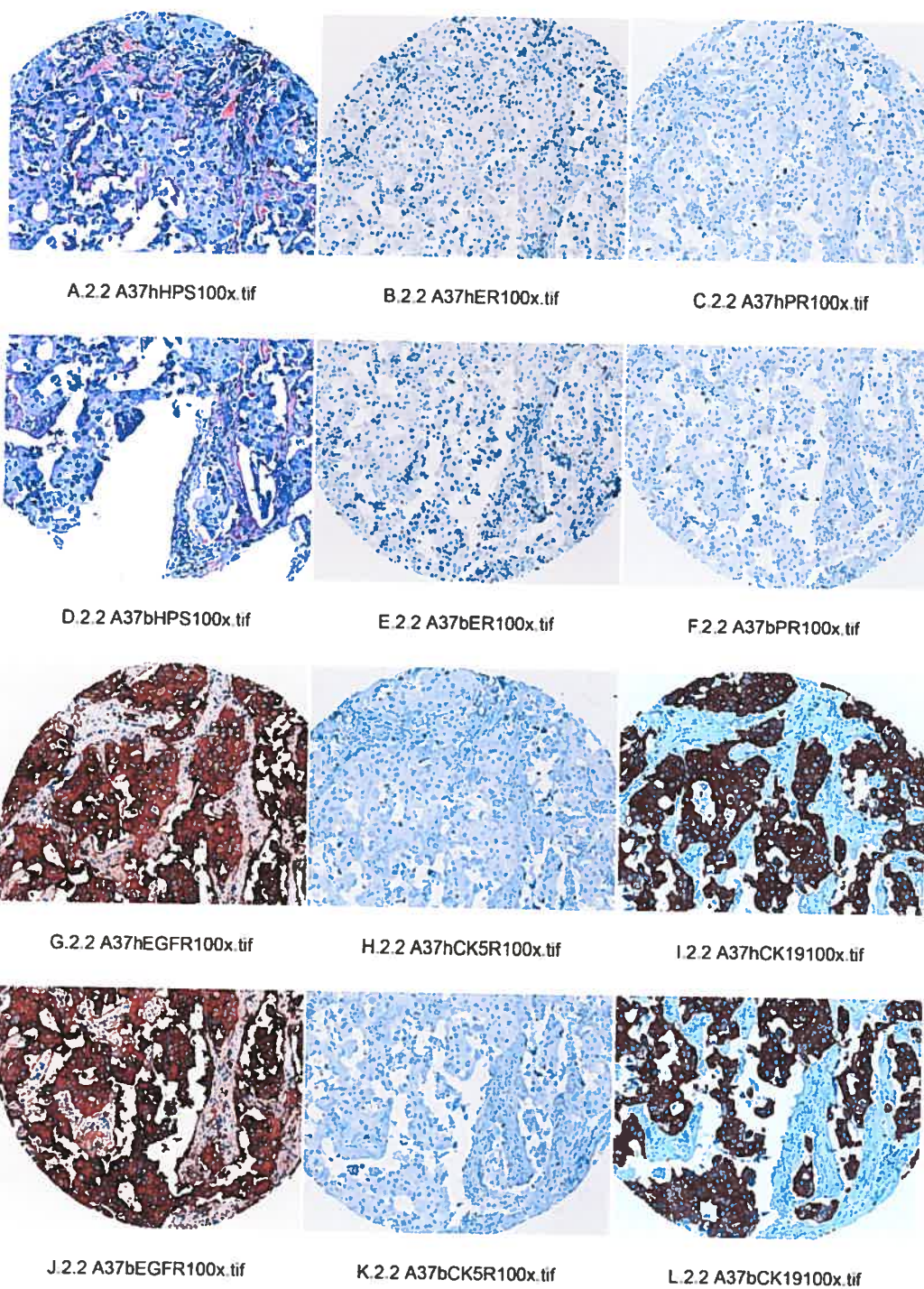
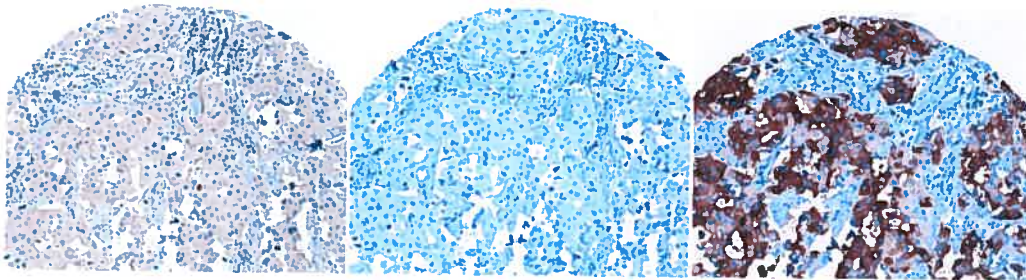
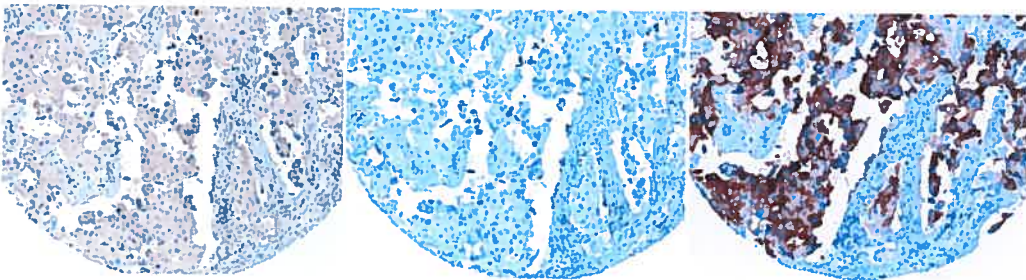
Figure 26 : Cas 37 (première partie)

Figure 26 : Cas 27 (deuxième partie)

M.2.2 A37hCK17100x.tif

N.2.2 A37hCK14100x.tif

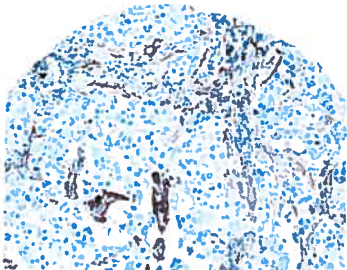
O.2.2 A37hEMA100x.tif



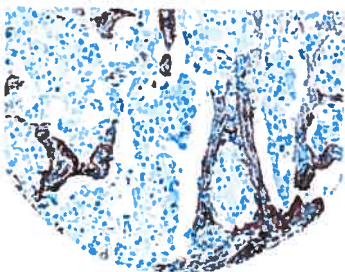
P.2.2 A37bCK17100x.tif

Q.2.2 A37bCK14100x.tif

R.2.2 A37bEMA100x.tif



S.2.2 A37hSMA100x.tif



T.2.2 A37bSMA100x.tif

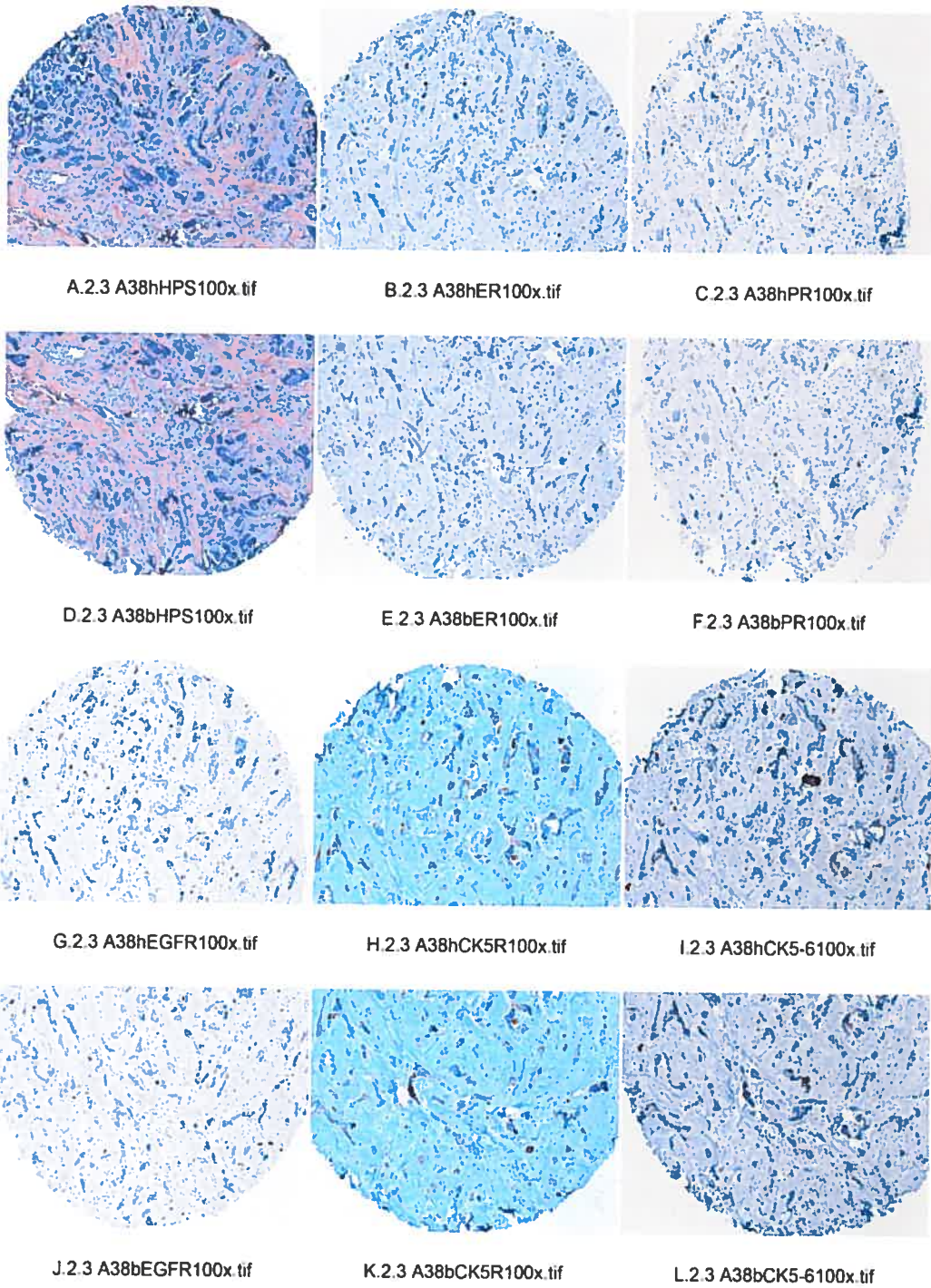
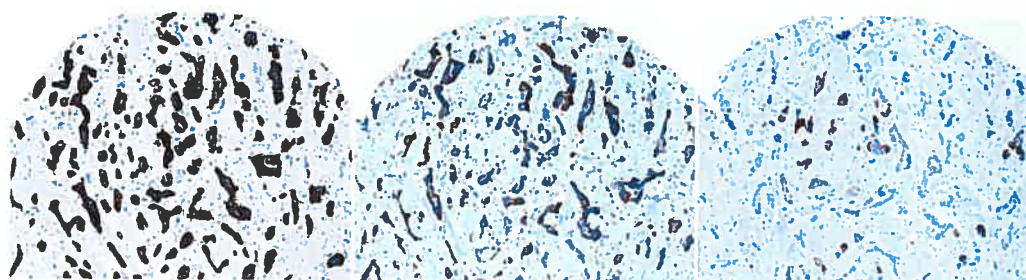
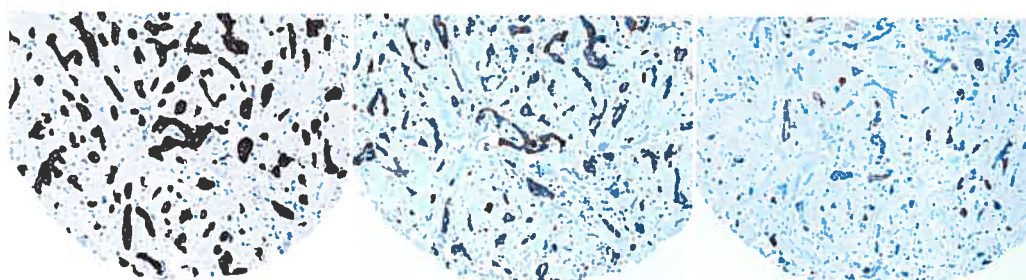
Figure 27 : Cas 38 (première partie)

Figure 27 : Cas 38 (deuxième partie)

M.2.3 A38hCK19100x.tif

N.2.3 A38hCK17100x.tif

O.2.3 A38hCK14100x.tif



P.2.3 A38bCK19100x.tif

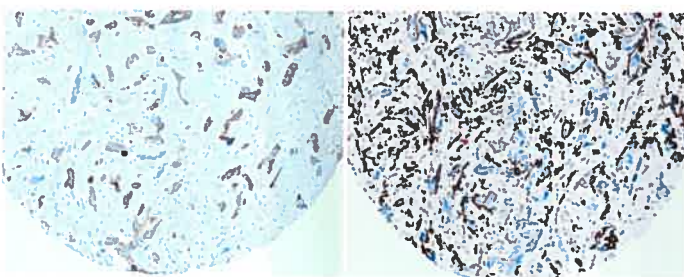
Q.2.3 A38bCK17100x.tif

R.2.3 A38bCK14100x.tif



S.2.3 A38hEMA100x.tif

T.2.3 A38hSMA100x.tif



U.2.3 A38bEMA100x.tif

V.2.3 A38bSMA100x.tif

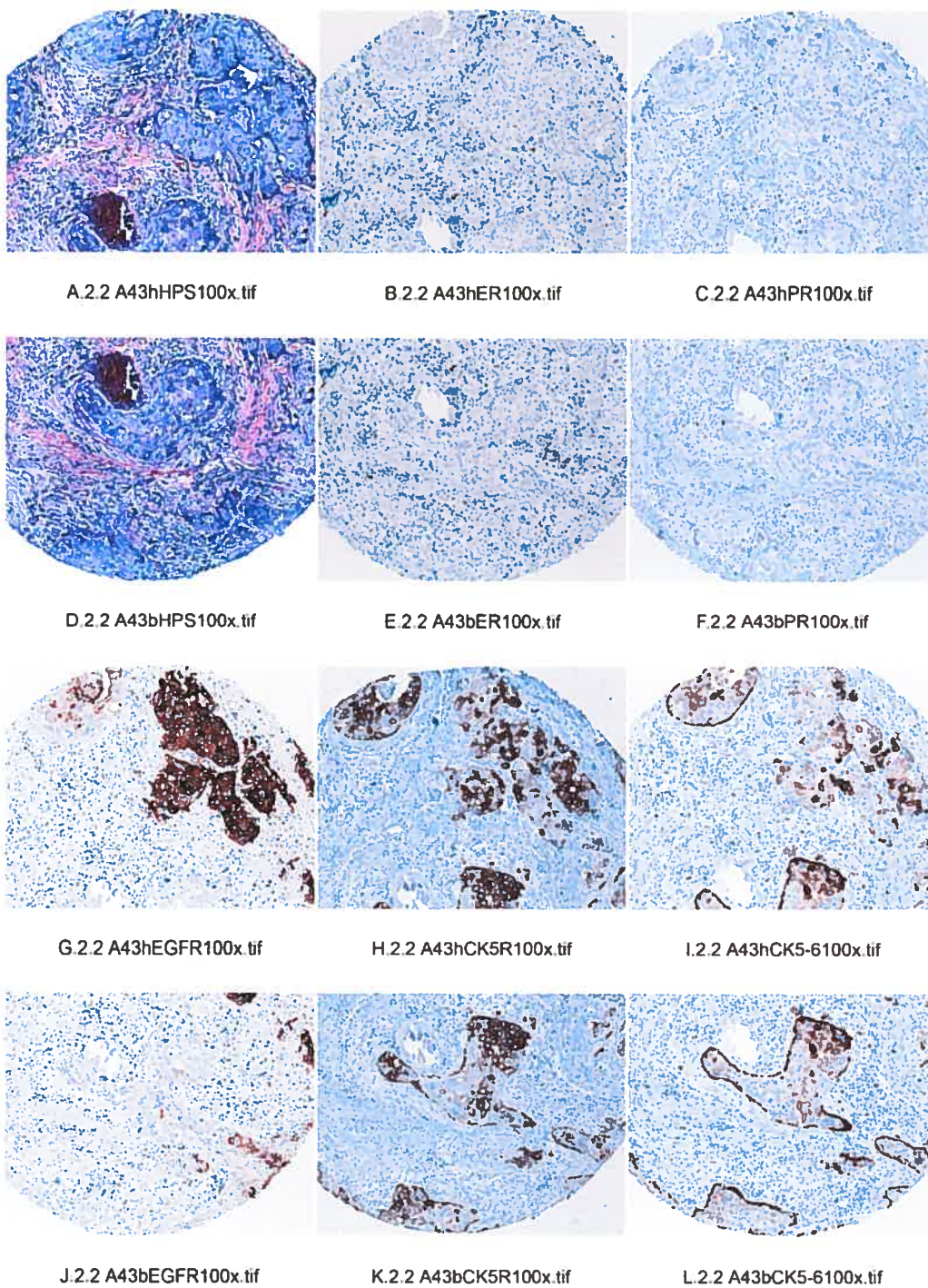
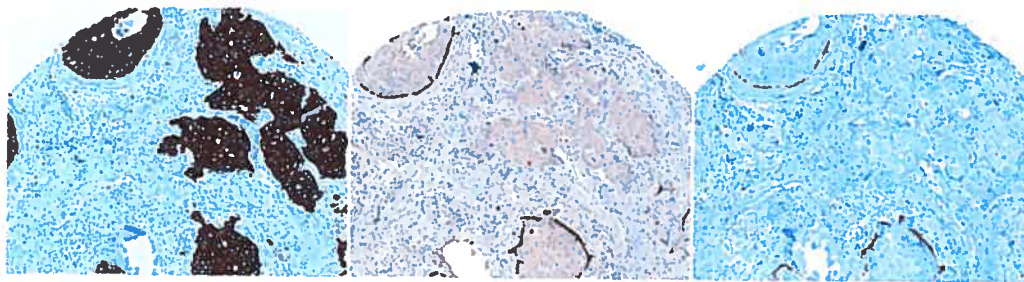
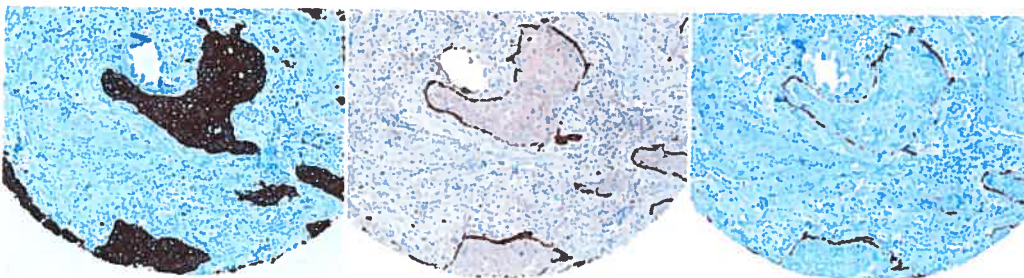
Figure 28 : Cas 43 (première partie)

Figure 28 : Cas 43 (deuxième partie)

M.2.2 A43hCK19100x.tif

N.2.2 A43hCK17100x.tif

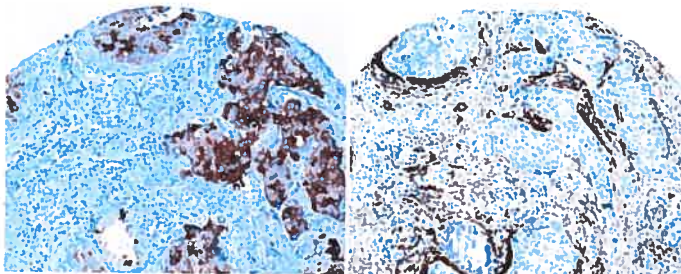
O.2.2 A43hCK14100x.tif



P.2.2 A43bCK19100x.tif

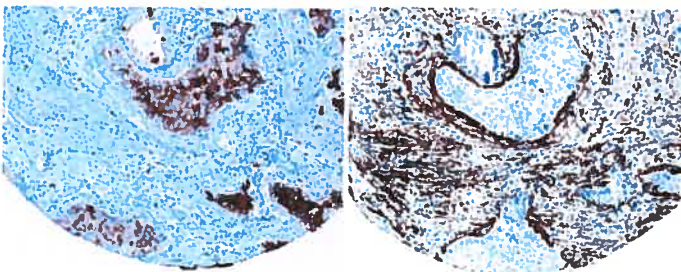
Q.2.2 A43bCK17100x.tif

R.2.2 A43bCK14100x.tif



S.2.2 A43hEMA100x.tif

T.2.2 A43hSMA100x.tif



U.2.2 A43b EMA100x.tif

V.2.2 A43bSMA100x.tif

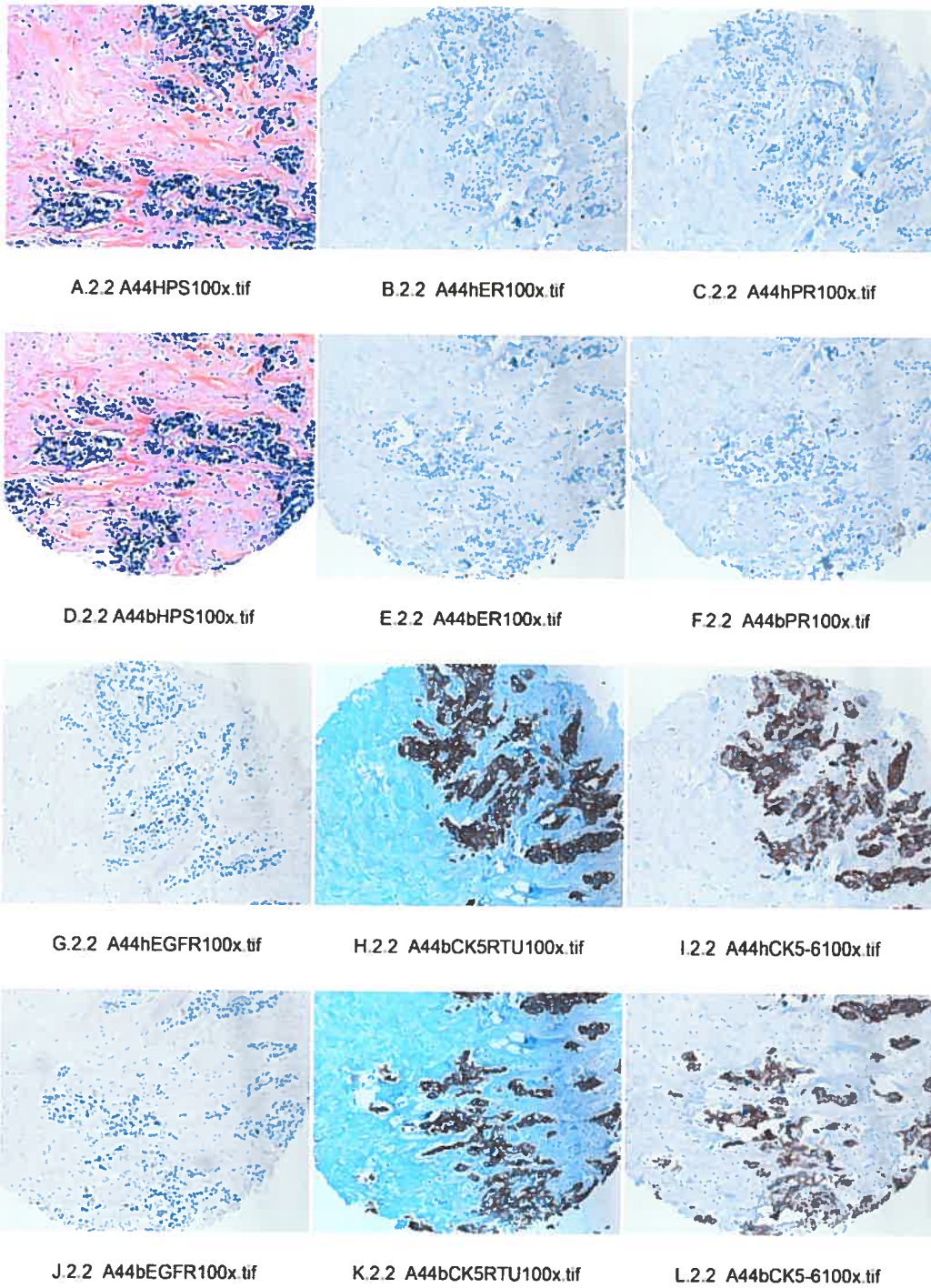
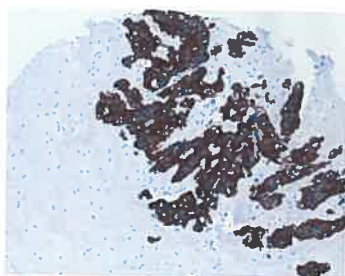
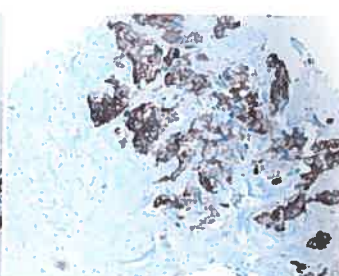
Figure 29 : Cas 44 (première partie)

Figure 29 : Cas 44 (deuxième partie)

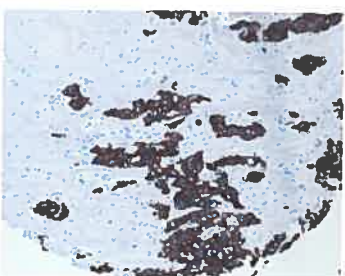
M.2.2 A44hCK19100x.tif



N.2.2 A44hCK17100x.tif



O.2.2 A44hCK14100x.tif



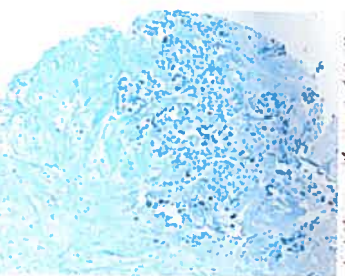
P.2.2 A44bCK19100x.tif



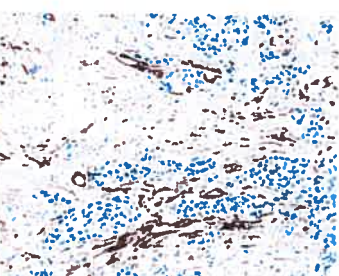
Q.2.2 A44bCK17100x.tif



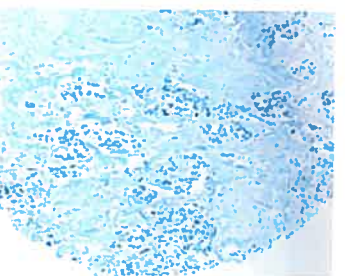
R.2.2 A44bCK14100x.tif



S.2.2 A44hEMA100x.tif



T.2.2 A44 SMA 100x.tif



U.2.2 A44bEMA100x.tif

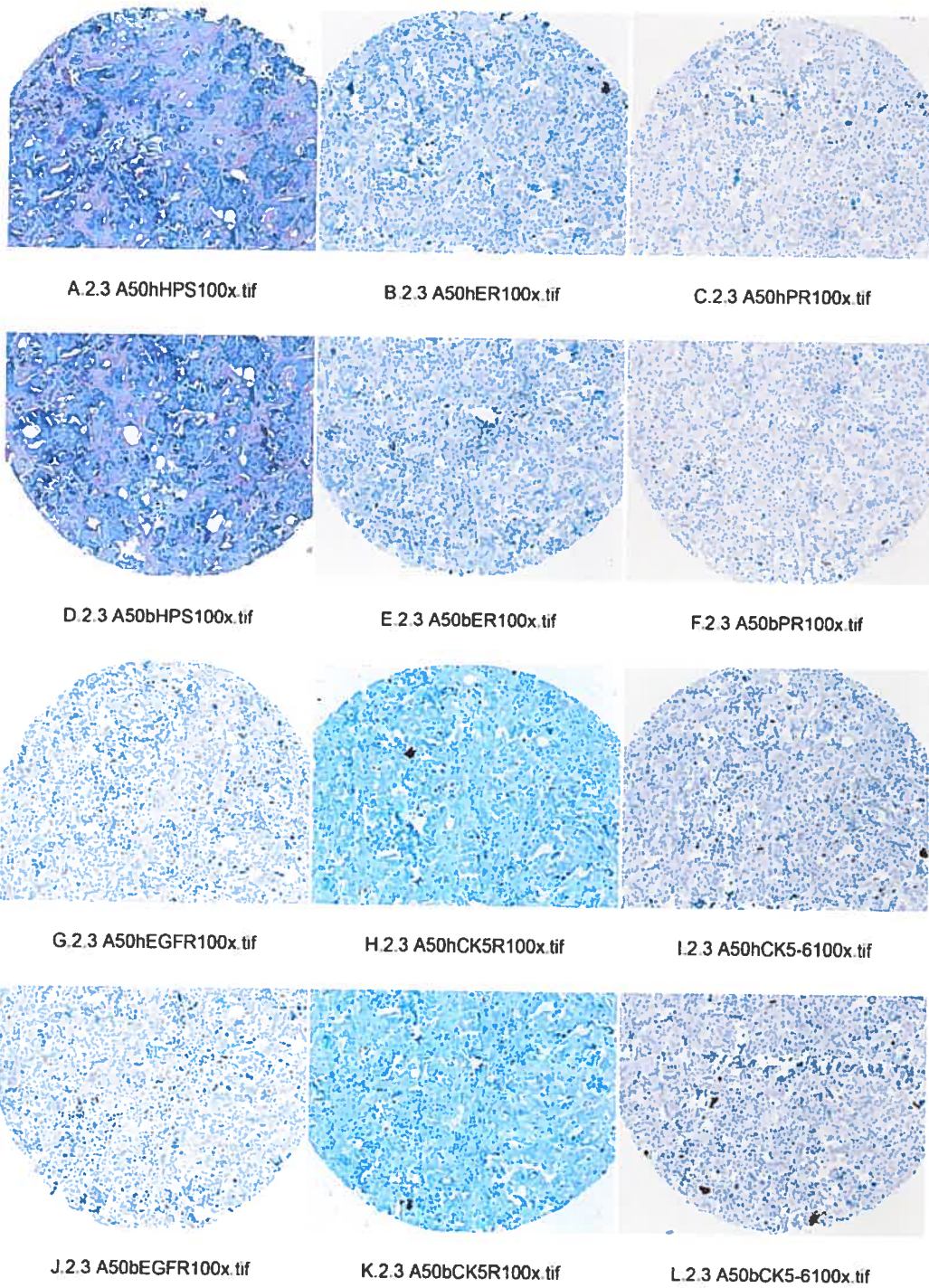
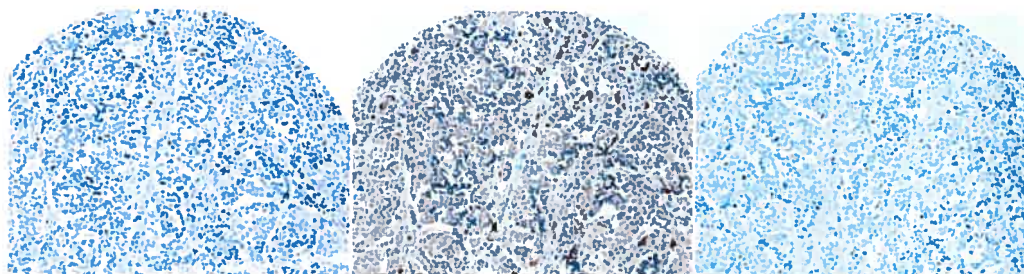
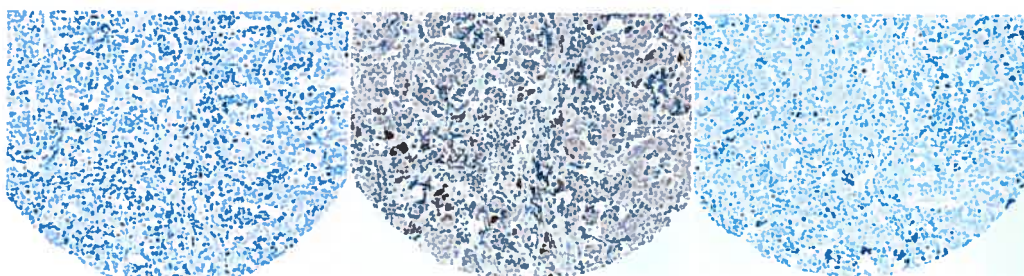
Figure 30 : Cas 50 (première partie)

Figure 30 : Cas 50 (deuxième partie)

M.2.3 A50hCK19100x.tif

N.2.3 A50hCK17100x.tif

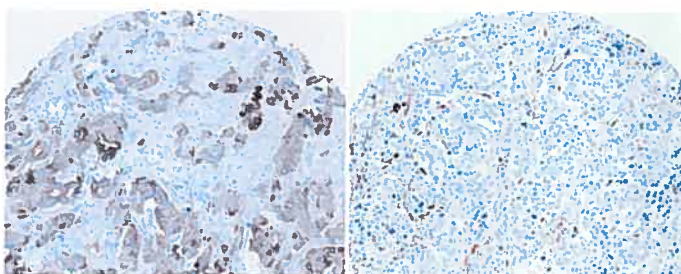
O.2.3 A50hCK14100x.tif



P.2.3 A50bCK19100x.tif

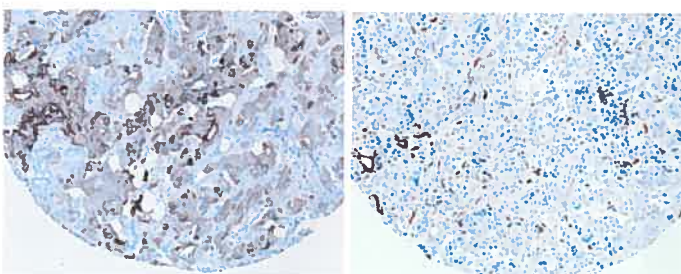
Q.2.3 A50bCK17100x.tif

R.2.3 A50bCK14100x.tif



S.2.3 A50hEMA100x.tif

T.2.3 A50hSMA100x.tif



U.2.3 A50bEMA100x.tif

V.2.3 A50bSMA100x.tif

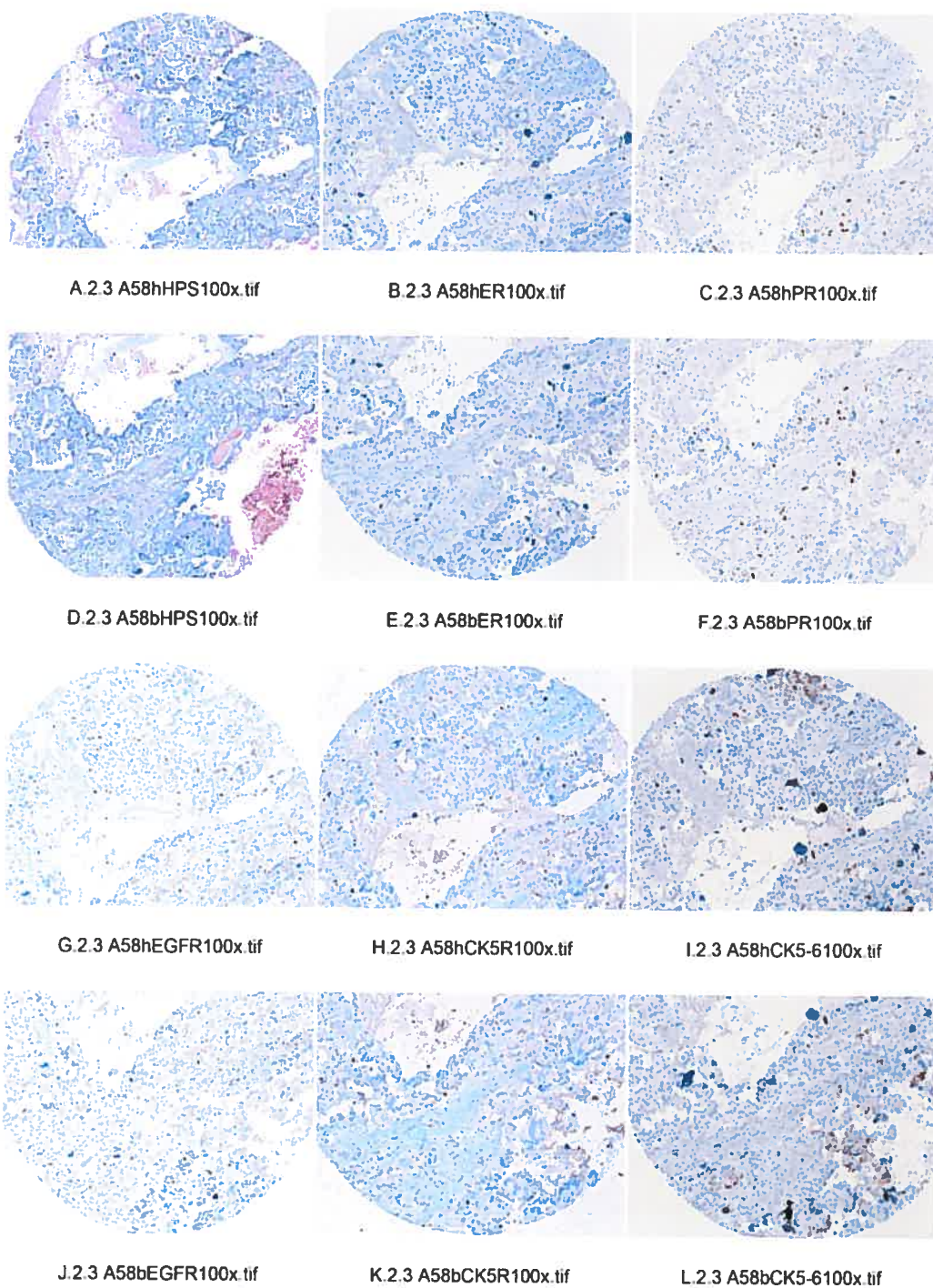
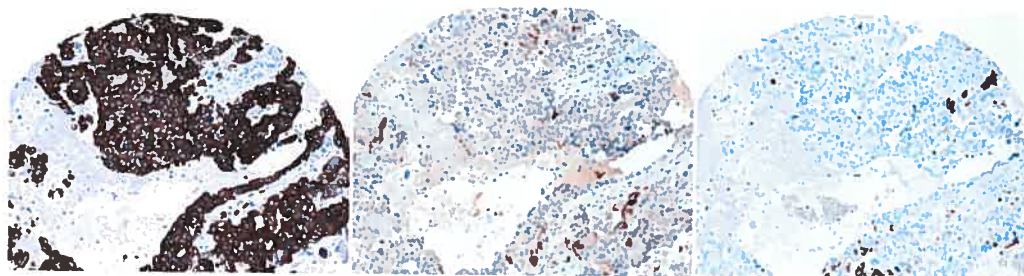
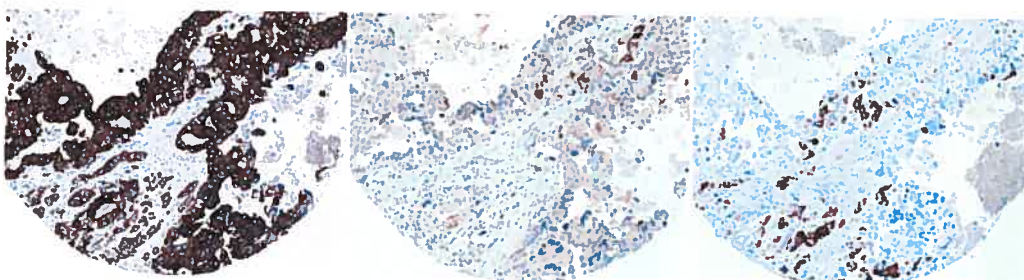
Figure 31 : Cas 58 (première partie)

Figure 31 : Cas 58 (deuxième partie)

M.2.3 A58hCK19100x.tif

N.2.3 A58hCK17100x.tif

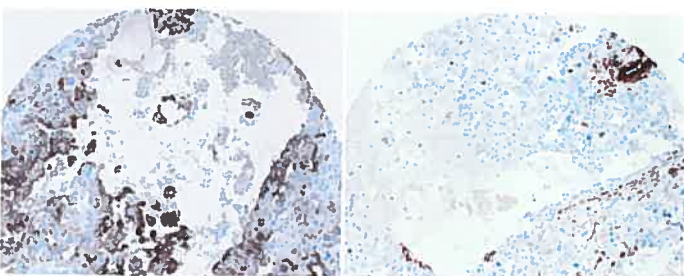
O.2.3 A58hCK14100x.tif



P.2.3 A58bCK19100x.tif

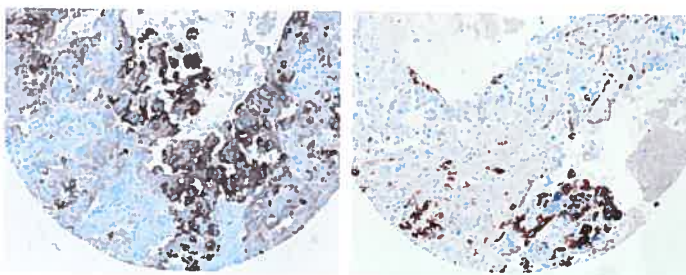
Q.2.3 A58bCK17100x.tif

R.2.3 A58bCK14100x.tif



S.2.3 A58hEMA100x.tif

T.2.3 A58hSMA100x.tif



U.2.3 A58bEMA100x.tif

V.2.3 A58bSMA100x.tif

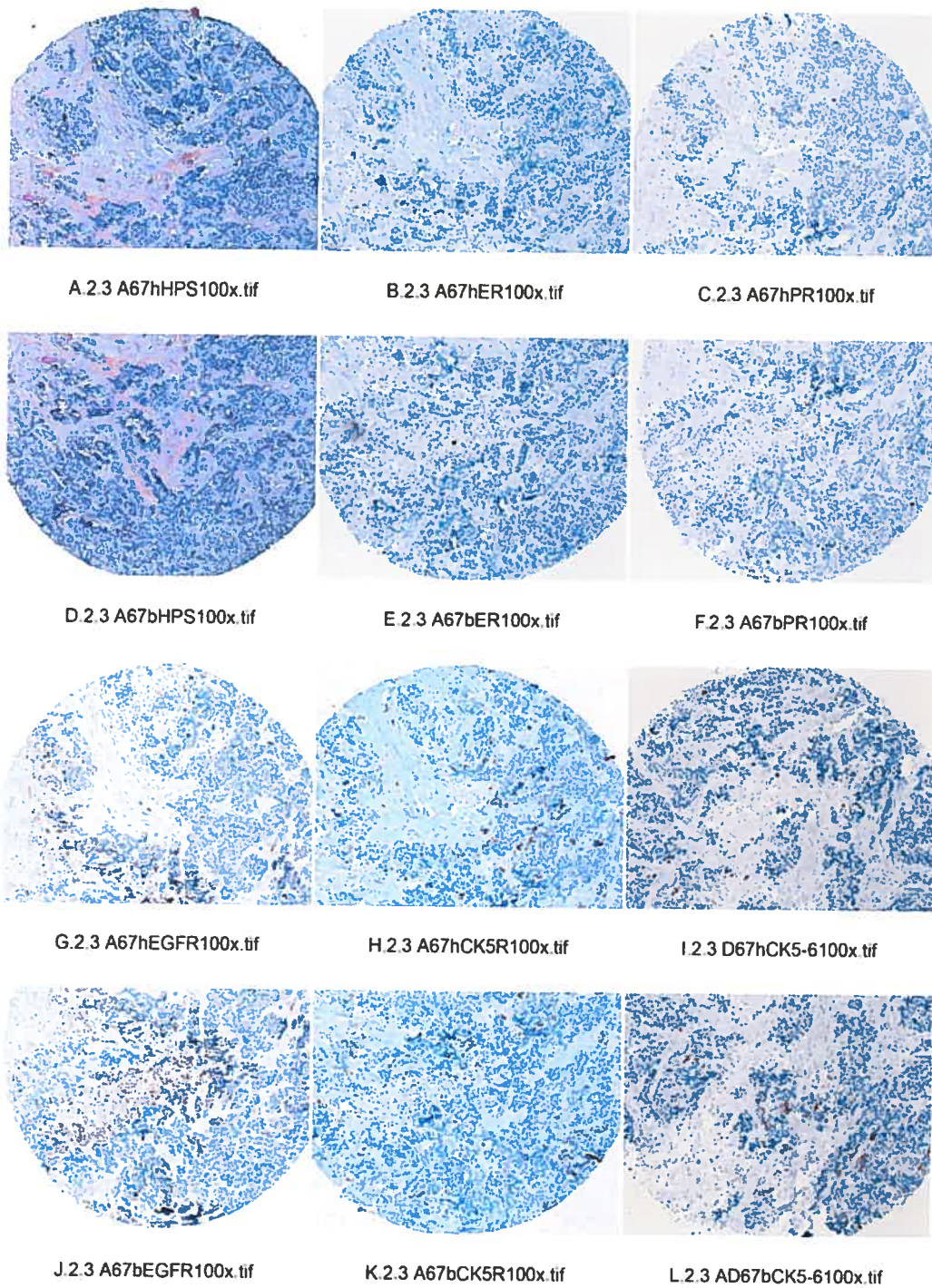
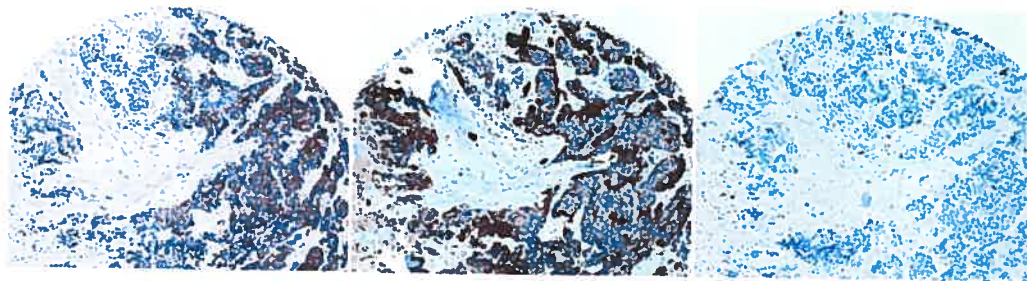
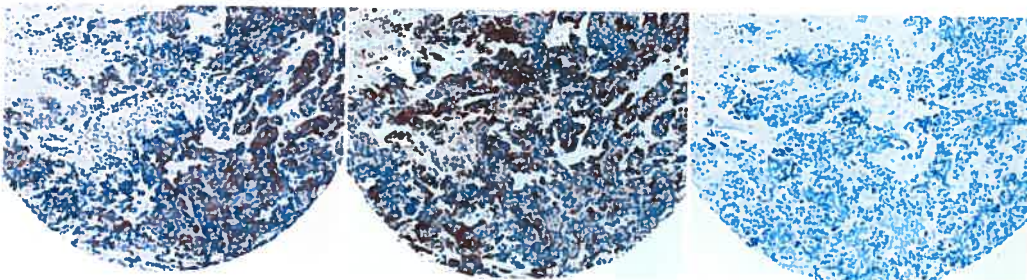
Figure 32 : Cas 67 (première partie)

Figure 32 : Cas 67 (deuxième partie)

M.2.3 A67hCK19100x.tif

N.2.3 A67hCK17100x.tif

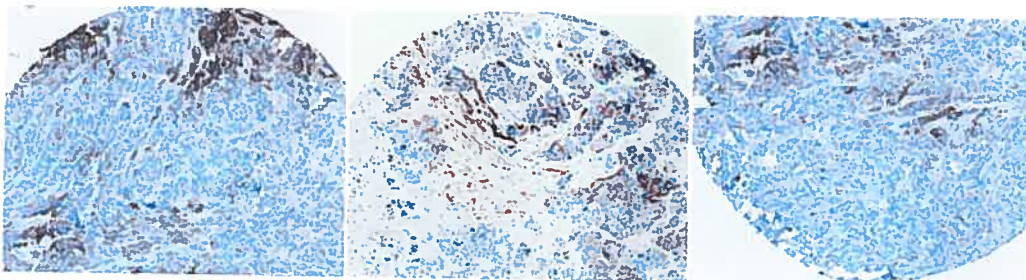
O.2.3 A67hCK14100x.tif



P.2.3 A67bCK19100x.tif

Q.2.3 A67bCK17100x.tif

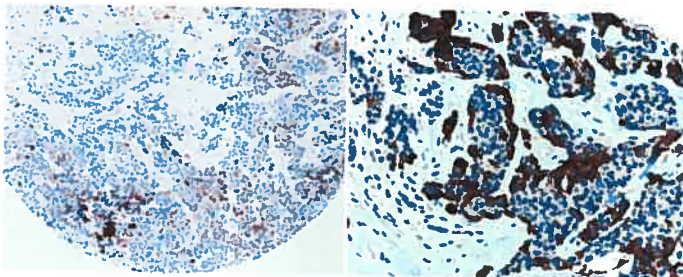
R.2.3 A67bCK14100x.tif



S.2.3 B67hEMA100x.tif

T.2.3 A67hSMA100x.tif

U.2.3 B67bEMA100x.tif



V.2.3 A67bSMA100x.tif

Xq.2.3 A67CK17200x.tif

III. CARACTERISATION DES TUMEURS PAR FISH

III.1 Récapitulation des résultats pour le FISH TOPO2A et HER-2

Voir le tableau X.

Tableau X: Récapitulation des résultats pour le FISH TOPO2A et HER-2 (première partie)

Patient	Âge	HER2 IHC	HER2 FISH	TOPO2A FISH
1	46	-	Non A	Non A
2	57	-	Non A	Non A
3	59	-	Non A	Non A
4	44	-	X	X
5	72	-	Non A	Non A
6	60	-	Non A	Non A
7	44	-	Non A	Non A
8	55	-	Non A	Non A
9	60	-	Non A	Non A
10	41	-	X	X
11	45	-	Non A	Non A
12	75	-	Non A	Non A
13	60	-	Non A	Non A
14	48	-	Non A	Non A
15	42	-	Non A	Non A
16	54	-	Non A	Non A
17	49	-	Non A	Non A
18	45	-	Non A	Non A
19	45	-	Non A	Non A
20	43	-	Non A	Non A
21	75	-	Non A	Non A
22	48	-	Non A	Non A
23	70	-	Non A	Non A
24	66	-	Non A	Non A
25	75	-	Non A	Non A
26	42	-	X	X
27	51	-	Non A	Non A
28	61	-	Non A	X
29	43	-	X	Non A
30	56	-	Non A	Non A
31	50	-	Non A	Non A
32	75	-	Non A	Non A
33	38	-	Non A	Non A
34	84	-	Non A	Non A
35	44	-	Non A	Non A

Légende: **HER2IHC:** Statut du récepteur HER-2 en IHC d'après les rapports pathologiques du CHUM: +: expression du récepteur, -: pas d'expression. **HER2FISH:** Résultats en FISH pour le gène HER2. **HER2TOPO2AFISH:** Résultats en FISH pour le gène de la topoisomérase2A. **Non A:** Pas d'amplification du gène. **A:** Amplification du gène **X:** Résultat non disponible.

Tableau X: Récapitulation des résultats pour le FISH TOPO2A et HER-2 (deuxième partie)

Patient	Âge	HER2IHC	HER2FISH	TOPO2AFISH
36	52	?	Non A	Non A
37	50	?	Non A	Non A
38	44	?	Non A	Non A
39	55	+	A	Non A
40	47	+	A	Non A
41	45	+	A	Non A
42	61	+	A	A
43	73	+	Non A	Non A
44	78	+	A	A
45	85	+	A	A
46	68	+	A	A
47	48	+	A	Non A
48	62	+	A	Non A
49	62	+	A	A
50	50	+	A	Non A
51	57	-	Non A	Non A
52	65	-	Non A	Non A?
53	51	-	A	Non A
54	74	-	Non A	Non A
55	56	-	Non A	Non A
56	42	-	A	A
57	32	-	Non A	Non A
58	62	-	Non A	Non A
59	72	+	A	Non A
60	80	+	A	Non A
61	59	+	A	A
62	34	+	A	Non A
63	56	+	X	
64	47	-	Non A	Non A
65	51	-	Non A	Non A
66	57	-	Non A	Non A
67	54	-	Non A	Non A
68	58	+	A	Non A

Légende: **HER2IHC:** Statut du récepteur HER-2 en IHC d'après les rapports pathologiques du CHUM: +: expression du récepteur, -: pas d'expression. ?: résultat non disponible. **HER2FISH:** Résultats en FISH pour le gène HER2. **HER2TOPO2AFISH:** Résultats en FISH pour le gène de la topoisomérase2A. **Non A:** pas d'amplification. **A:** Amplification du gène. **X:** Résultat non disponible. Pour le cas 52, le signal d'hybridation du gène de la topo2A s'est avéré trop faible pour être surs du résultat.

III.2 HER-2

Evaluation de la technique FISH sur le TMA

La procédure décrite dans la section "matériels et méthodes" nous a permis d'obtenir des résultats concluants pour nos trois TMA. La sonde a été appliquée sur deux des trois sub-micromatrices par TMA, deux carottes tumorales par tumeur ont été donc hybridées et analysées. La lecture a été réalisée par deux observateurs indépendants: Dr F. Jolicoeur et moi même.

Nous avons obtenu des résultats pour tous les cas de la micromatrice à l'exception du cas 29. Par ailleurs, les carottes des cas 7 et 22 ont été prélevées dans le tissu adipo-stromal entourant la tumeur, l'hybridation concerne donc des cellules stromales et non tumorales. En ce qui concerne le cas 48, malgré une prépondérance de tissu stromal, 10% d'une des trois carottes était composée de tissu tumoral. Les cellules tumorales ont été facilement repérées en microscopie à fluorescence (grâce à la superposition aux lames HPS d'une part, à la forme des noyaux tumoraux d'autre part, et à la présence nette d'une amplification de l'oncogène), ce matériel nous a donc semblé suffisant pour considérer le résultat concluant. En conclusion, notre TMA nous a permis d'obtenir un résultat de FISH pour 61 des 64 patientes sélectionnées, c'est à dire, un taux supérieur à 95% de la cohorte.

Parmi ces 61 patientes, nous avons obtenu deux carottes tumorales analysables pour 51 d'entre elles. Nous avons obtenu des résultats de FISH concordants pour les deux carottes dans 50 paires de carottes. Pour la patiente 62, le ratio HER-

2/centromère 17 de la carotte de la sub-micromatrice B est de 1.5; ce qui est considéré non amplifié. En revanche dans la sub-micromatrice A, le ratio est supérieur à 2, et donc amplifié. Pour cette raison, nous avons considéré le cas comme amplifié.

On a donc 98% de concordance entre les deux carottes d'une même tumeur.

La figure 33 illustre un cas (cas 61) de carcinome mammaire avec amplification de HER2 par FISH.

Corrélation entre ICH et FISH

Des dix-sept cas préalablement positifs en IHC au CHUM pour HER-2, seize cas se sont avérés amplifiés par FISH. Le cas 43, positif en IHC pour HER-2, n'a pas présenté d'amplification du gène HER-2 en FISH (voir tableau X). Des quarante cas préalablement négatifs en IHC pour HER-2, deux cas se sont avérés positifs par FISH (cas 53 et 56). (Voir tableau X.)

On peut donc dire que dans notre cohorte, 94% des tumeurs avec surexpression de l'oncogène en IHC ont présenté une amplification en FISH; alors que 6% des tumeurs avec expression de l'oncogène en IHC se sont avérés non amplifiés par FISH.

Par ailleurs, 95% des tumeurs sans sur expression de l'oncogène en IHC n'ont pas eu d'amplification par FISH; par contre, 5% des cas considérés non sur exprimés en IHC, se sont avérés amplifiés.

Les carcinomes basaux et HER-2

Parmi les vingt-neuf tumeurs de phénotype basal en IHC, deux de ces tumeurs ont présenté une surexpression en IHC et une amplification par FISH de l'oncogène HER-2 (cas 44 et 50). 7% des tumeurs avec phénotype basal ont donc une sur expression et amplification de l'oncogène HER-2 dans notre cohorte.

Par ailleurs, des dix-sept cas avec surexpression, et des dix-huit cas avec amplification de l'oncogène, deux de ces cas ont montré un phénotype basal en IHC. En conclusion 5% des tumeurs avec surexpression et ou amplification de HER-2 ont un phénotype basal dans notre cohorte.

Le cas 44 est illustré à la figure 34.

III.3 TOPO2A

Résultats de FISH TOPO2A sur le TMA

L'intensité du signal d'hybridation obtenu a été plus faible que celle obtenue pour le gène HER-2. Par ailleurs, la variation de l'intensité entre les différentes carottes a aussi été plus marquée qu'avec le FISH HER-2. Pour optimiser nos résultats, nous avons varié les temps de digestion avec la pepsine (dix et dix-sept minutes), mais aucune différence significative n'a été notée. Un temps plus élevé de digestion ne nous a pas permis d'obtenir une augmentation du signal d'hybridation. Nous avons appliqué 30 µl de sonde par lame de MMT avec le but de couvrir l'ensemble de la MMT.

Le meilleur signal d'hybridation a été obtenu dans la "sub-micromatrice" A pour la MMT 2.1, et dans les "sub-micromatrices" B pour les MMT 2.2 et 2.3. Nous nous sommes basés sur ces « sub-micromatrices » pour évaluer nos résultats. Dans les cas où les carottes étaient non disponibles ou non concluantes nous avons utilisé les autres "sub-micromatrices".

Nous avons obtenu des résultats pour tous les carcinomes du TMA à l'exception de deux cas:

- cas 28 où deux carottes se sont décollées de la lame, et l'hybridation de la dernière carotte a été insatisfaisante.
- Cas 52 où malgré la présence de deux carottes par cas, le signal d'hybridation a été trop faible pour l'évaluer.

Parmi les 61 cas analysés, sept cas ont montré une amplification, il s'agit des cas : 42, 44, 45, 46, 49, 56 et 61. Ceci représente 11% de la cohorte. (Voir le tableau X.)

Les cas 44 et 61 sont illustrés aux figures 33 et 34.

Correlation HER-2 et topo2A

Tous les cas d'amplification de Topo2A ont été retrouvés chez des carcinomes présentant aussi une amplification du gène HER-2. Nous n'avons donc pas identifié de cas d'amplification de topo2A sans amplification du gène HER-2 concomitante.

Par ailleurs, 44% des tumeurs avec amplification du gène HER-2 ont aussi une amplification du gène topo2A dans notre cohorte.

Topo2A et carcinomes basaux

Parmi nos 32 cas de carcinomes avec un phénotype basal, un seul cas, le cas 44, a présenté une amplification de la topoisomérase. En conclusion: 97% des tumeurs de phénotype basaux ne s'accompagnent pas d'amplification du gène de la topoisomérase 2A dans notre cohorte.

III.4 Illustrations

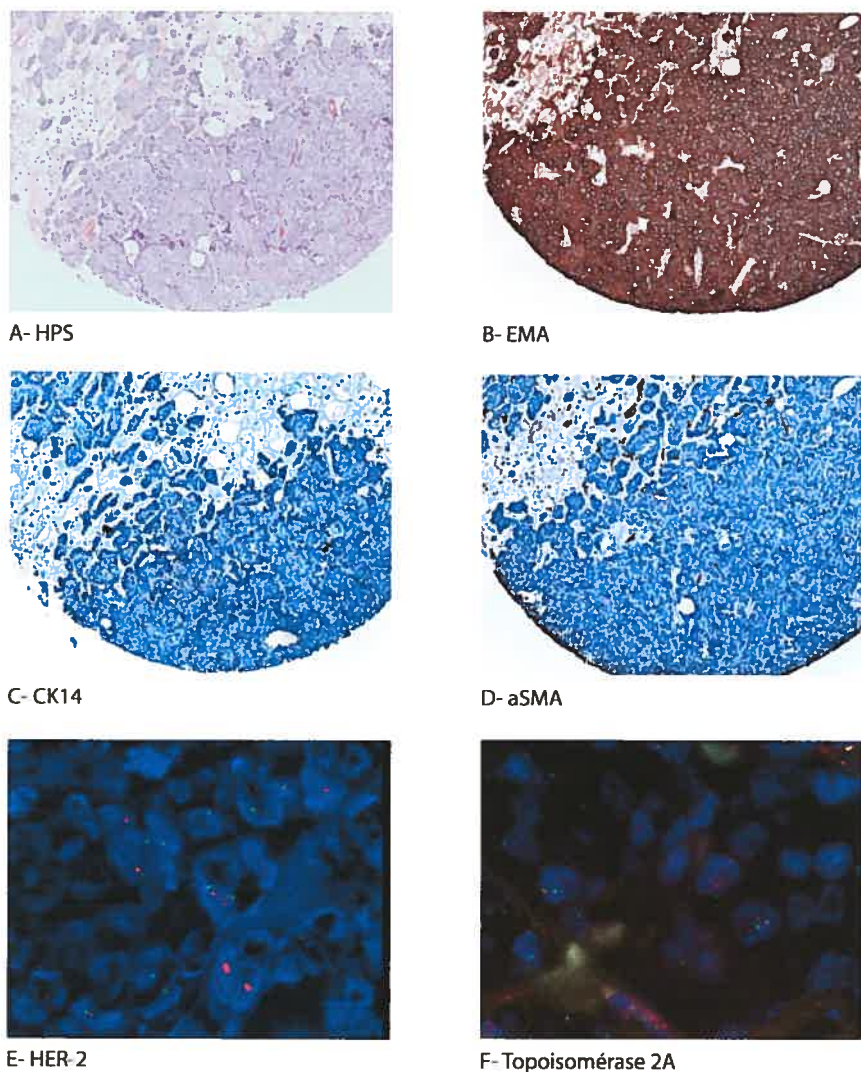


Figure 33. Carcinome négatif pour le phénotype basal, présentant une amplification du gène HER-2 et du gène de la topoisomérase 2A (cas 61).

Légende: **A:** Coloration de la tumeur en HPS, 100x. **B:** Marquage positif en IHC avec le marqueur apical anti-EMA. 100X. **C:** Marquage négatif en IHC avec le marqueur basal anti-CK14, 100X. **D:** Marquage négatif en IHC avec le marqueur basal anti-aSMA, 100X. **E:** HER-2 amplifié en FISH. (FITC (signal vert pour le centromère), Texas Red (signal rouge pour le gène HER2), DAPI (noyaux en bleu.)). 1600X. **F:** Topoisomérase 2A amplifiée en FISH. (FITC (signal vert pour le centromère), Texas Red (signal rouge pour le gène Topo2A), DAPI (noyaux en bleu.)). 1600X.

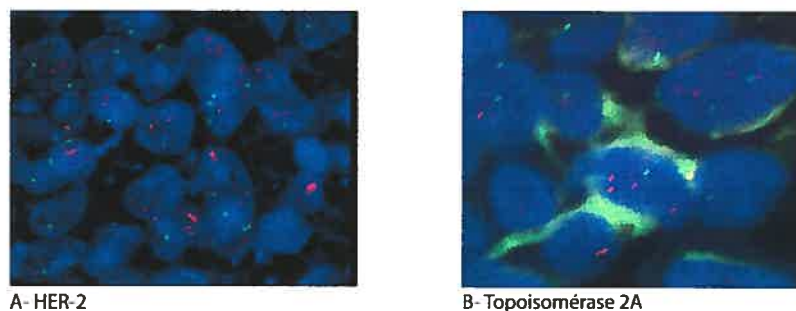


Figure 34. Carcinome basal présentant une amplification du gène HER-2 et de la topoiosomérase 2A (cas 44).

Légende: A: HER-2 amplifié en FISH. (FITC (signal vert pour le centromère), Texas Red (signal rouge pour le gène HER2), DAPI (noyaux en bleu.)).1600X. B: Topoisomérase 2A amplifiée en FISH. (FITC (signal vert pour le centromère), Texas Red (signal rouge pour le gène Topo2A), DAPI (noyaux en bleu.)).3000X. Les résultats en IHC sont illustrés à la figure 29.

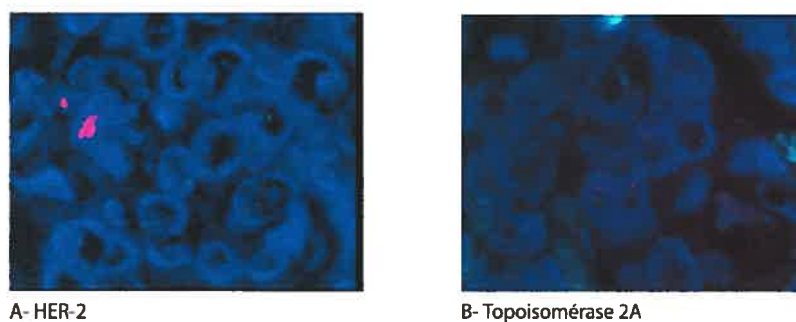


Figure 35: Carcinome basal ne présentent pas d'amplification du gène HER-2 ni du gène de la topoiosomérase 2A (cas 13).

Légende: A: HER-2 amplifié en FISH. (FITC (signal vert pour le centromère), Texas Red (signal rouge pour le gène HER2), DAPI (noyaux en bleu.)).1600X. B: Topoisomérase 2A amplifiée en FISH. (FITC (signal vert pour le centromère), Texas Red (signal rouge pour le gène Topo2A), DAPI (noyaux en bleu.)).1600X. Les résultats en IHC sont illustrés à la figure 10.

SOMMAIRE DES RÉSULTATS

Nous avons recherché et caractérisé des carcinomes mammaires présentant des caractéristiques basales en IHC. Ces carcinomes proviennent de deux cohortes de patientes récemment opérées pour un carcinome mammaire au CHUM.

La première cohorte nous a servi à choisir les types tumoraux à étudier, et à optimiser l'étude des tumeurs de phénotype basal dans une deuxième cohorte.

La première cohorte a été constituée en sélectionnant arbitrairement soixante-quatre patientes opérées au CHUM pour lesquelles nous avons accès aux blocs tumoraux et aux dossiers cliniques avec les comptes-rendus pathologiques.

Nous avons procédé à des marquages en IHC sur des coupes tissulaires réalisées à partir des prélèvements tumoraux enrobés en paraffine. A l'aide de trois marqueurs des cellules basales/myoépithéliales (CK14, CK17, aSMA) nous avons identifié dix-sept carcinomes positifs pour au moins l'un de ces marqueurs; quatorze d'entre eux co-expriment au moins deux de ces marqueurs.

Comme prévu par la littérature, la plupart des tumeurs marquant à la CK14, à la CK17 et à l'aSMA sont des tumeurs de haut grade, qui n'expriment pas les récepteurs d'estrogène et de progestérone, et qui ne sur-expriment pas l'oncogène HER-2. Il s'agit dans tous les cas de carcinomes canalaire.

Nous avons tout de même identifié, parmi les carcinomes possédant un immunophénotype basal, un carcinome exprimant des récepteurs de progestérone,

et un autre présentant une surexpression du gène HER-2. Par ailleurs, deux carcinomes étaient de bas grade.

Le marquage s'est avéré très hétérogène d'une tumeur à l'autre: certaines tumeurs affichaient un marquage très focal pour les marqueurs basaux, d'autres tumeurs étaient marquées de façon diffuse. La combinaison des marqueurs basaux localisés en IHC variait aussi d'une tumeur à l'autre. Par ailleurs, dans certains cas, nous avons aussi retrouvé une hétérogénéité intra-tumorale quant à la distribution et à l'intensité du marquage en IHC pour les divers marqueurs utilisés; par exemple, au sein d'une même tumeur, certaines populations cancéreuses expriment une CK basale mais non l'aSMA, alors que d'autres populations cancéreuses à proximité ont exprimé l'aSMA sans expression concomitante de cette même CK basale. Cette hétérogénéité du marquage est illustrée à la figure 3.

Les principales caractéristiques histologiques retrouvées dans ces tumeurs sont les suivantes : importance de la réaction stromale, infiltrat inflammatoire, et nécrose étendue.

L'évolution clinique variait aussi d'un cas à l'autre. Plusieurs cas ont conservé jusqu'ici une évolution favorable, mais il faut rappeler que le suivi clinique n'excède pas trois ans.

Par ailleurs, certains cas ont présenté une évolution fulminante, ces tumeurs n'ont pas répondu aux traitements, entraînant le décès des patientes dans l'année suivant le diagnostic.

A partir de ces résultats, nous avons constitué une seconde cohorte, comprenant cette fois 68 cas. Celle-ci comprenait uniquement de carcinomes canaux et médullaires, majoritairement de haut grade, n'exprimant pas les récepteurs hormonaux et n'affichant pas de sur-expression du gène HER-2.

Nous avons aussi inclus comme contrôles des carcinomes canaux sur-exprimant l'oncogène HER-2, et quelques carcinomes exprimant les récepteurs de progestérone.

A partir des blocs tumoraux nous avons donc construit des micromatrices tissulaires contenant trois carottes tumorales pour chacun des 68 cas.

A partir des coupes confectionnées de la micromatrice, nous avons réalisé de l'IHC et du FISH. Nous avons utilisé cinq marqueurs des cellules basales (CK5, CK14, CK17, HER1, aSMA) et deux marqueurs des cellules luminales (EMA et CK19) pour caractériser les tumeurs en IHC. Le statut des récepteurs ER et PR a été ré-vérifié en IHC. Deux sondes ont été utilisées en FISH: une sonde pour le gène HER-2 et une pour le gène de la topoisomérase 2A. Nous avons comparé les résultats obtenus en IHC (réalisés à l'Hôtel-Dieu) et en FISH pour HER-2. En tout, 32 tumeurs de phénotype basal ont été identifiées par IHC. Plus de la moitié des cas exprimaient au moins trois des marqueurs basaux. Comme dans la première cohorte, la plupart des cas (90%) n'expriment pas les récepteurs hormonaux et n'affichent pas de sur-expression et/ou d'amplification du gène HER-2. Tout de même, nous avons, à nouveau, retrouvé quelques tumeurs exprimant des récepteurs de progestérone et des tumeurs avec amplification de HER-2 positives

pour les marqueurs basaux. Nous avons identifié une seule tumeur basale présentant une amplification de la topoisomérase, toutes les autres étant négatives. De nouveau, les marquages en IHC ont été hétérogènes entre les différents spécimens et variaient d'une région à l'autre d'une même tumeur. Dans beaucoup des cas, le marquage conjoint de CK basales et d'aSMA au sein d'une même tumeur, concernait des groupes cellulaires tumoraux distincts. La majorité des tumeurs exprimaient également les marqueurs apicaux EMA et CK19; cela dit, 24% et 33% des tumeurs sont respectivement en partie, ou en totalité, composées de cellules tumorales silencieuses pour ces marqueurs.

Contrairement à certaines études [57, 64, 65], nous n'avons pas retrouvé de différence significative entre l'âge des patientes présentant ou non une tumeur de phénotype basal.

Notre deuxième cohorte nous a permis de mieux cerner les principales caractéristiques histologiques de ces tumeurs : nécrose étendue, inflammation et desmoplasie.

DISCUSSION

I. GÉNÉRALITÉS

Les carcinomes mammaires qui possèdent des caractéristiques basales sont restés très longtemps méconnus, voir ignorés dans la pratique clinique. Depuis quelques années, les données apportées par les nouvelles technologies comme les puces à ADN ont suscité un vif intérêt pour ce type de cancers du sein.

L'équipe de Perou et collaborateurs [33] a été la première à identifier, parmi les carcinomes du sein, un groupe de cancers caractérisés par l'expression des gènes exprimés normalement par les cellules myoépithéliales/ basales du sein: les carcinomes de phénotype basal. Cette variété de cancers du sein comptait pour 15% des carcinomes de leur échantillon.

La nouvelle classification du cancer du sein par profil d'expression génétique reconnaît deux types principaux de carcinomes: les carcinomes exprimant des récepteurs hormonaux, et ceux ne les exprimant pas [33, 68-70, 81].

Les tumeurs exprimant les récepteurs se ressemblent dans leur profil d'expression génétique par la forte expression de gènes exprimées par les cellules luminales du sein. Ils expriment aussi beaucoup de gènes déjà identifiés auparavant comme étant associés aux œstrogènes (GATA 3, X-box binding protein 1 etc.).

Le groupe de tumeurs où l'expression des récepteurs hormonaux fait défaut, est subdivisé en trois autres entités selon leur parenté d'expression : les tumeurs sur-

exprimant des gènes préférentiellement utilisés par les cellules basales, celles qui sur-expriment l'oncogène HER-2 et les gènes associés à HER-2, et, enfin, celles où le profil d'expression se rapproche du sein normal.

L'intérêt des carcinomes de phénotype basal est devenu majeur quand cette même équipe et d'autres chercheurs [68, 69] ont trouvé, toujours par des études de profil génétique par des puces à ADN, que ce type de cancers avait le plus mauvais pronostic parmi les autres classes de carcinomes identifiées. Ce nouveau concept n'est pas passé inaperçu par les experts: jusqu'ici, les cellules basales/myoépithéliales étaient considérées comme inoffensives, non sujettes à la transformation maligne ou tout bonnement absentes parmi les populations tumorales. L'innovation des puces à ADN aurait-elle permis de les identifier comme l'acteur principal des cancers les plus agressifs du sein?

En fait, l'implication des cellules basales/myoépithéliales, ou du moins l'existence de carcinomes mammaires agressifs assortis de caractéristiques des cellules basales, avait déjà été suggérée, voir démontrée, par des nombreuses études en microscopie électronique et en IHC.[44,57,58,83,84,86]. Malheureusement ces études ont eu très peu de retentissement et ne se sont pas traduites par des actions concrètes.

Actuellement, l'identification des cancers à phénotype basal se fait essentiellement au moyen des puces à ADN.

La validation des études par profil génétique est encore à une étape préliminaire: d'autres d'études sont nécessaires avant de pouvoir standardiser tant la méthode

que l'interprétation des données. Par ailleurs, les gènes constituant la matrice de la puce à ADN, ainsi que les gènes utilisés comme référence pour identifier les carcinomes basaux varient d'une étude à l'autre. Il n'y a donc pas de définition rigoureuse et universelle du profil d'expression génique des carcinomes de phénotype basal.

Par ailleurs, même si certaines des études ont validé certaines données du profil d'expression génique par de l'IHC [57, 67, 82], à ce jour, il n'y a toujours pas de critères parfaitement sensibles ou spécifiques, ni en histologie ni en IHC, pour identifier, avec assurance, les carcinomes de phénotype basal reconnus par les puces à ADN. Par conséquence, est-ce que le cancer de phénotype basal sort du domaine du pathologiste?

Deux tendances opposées sont en train de se développer dans la pratique courante. La première, "conservatrice" et sceptique face aux nouvelles tendances, qui nie l'importance du carcinome basal. L'autre, trop "avant-gardiste", prête à identifier comme carcinome basal tout carcinome de haut grade qui n'exprime pas les récepteurs hormonaux et qui ne surexprime pas le gène HER-2.

Peut-on "transposer" des données d'une méthodologie à l'autre? Etant donné que, selon la classification du cancer du sein par profil génétique, les carcinomes basaux constituent un groupe de carcinomes caractérisés par un défaut d'expression de gènes associés aux récepteurs hormonaux et à l'oncogène HER-2, peut-on appeler "carcinome basal" tout carcinome négatif pour ces récepteurs hormonaux en IHC et pour HER-2, en IHC ou FISH? Peut-on, comme certains

auteurs le prétendent, considérer comme carcinome basal tout carcinome marquant en IHC pour la CK5? [64, 65] ou pour la CK14 [83]? Quelle combinaison de marqueurs pourrait-elle mieux définir une éventuelle entité clinique? Quelle est la place et le rôle du pathologiste face à ces nouvelles données? Sommes-nous prêts à incorporer la recherche des carcinomes basaux dans la pratique clinique courante? Est-il opportun de le faire?

Nous sommes d'avis que l'IHC et la pathologie courante restent des outils essentiels pour la prise en charge du cancer du sein, et que leur potentiel n'a pas été exploité pleinement en ce qui a trait à la compréhension et à la caractérisation des carcinomes du sein de phénotype basal/myoépithelial. Nos résultats permettent, de vérifier que les carcinomes du sein avec des caractéristiques basales/myoépithéliales sont très fréquents en IHC, et que, par conséquent, la reconnaissance de cette entité est susceptible d'améliorer la prise en charge de certains cas de cancer du sein. Cependant, nos résultats soulèvent aussi un grand nombre de questions non résolues jusqu'à maintenant, et dont les réponses nous apparaissent indispensables pour mieux saisir la nature exacte de cette entité.

II. CARACTERISATION DU PHENOTYPE BASAL EN IHC ET FISH

Nos résultats indiquent que 26% et 52% des tumeurs de notre première et deuxième cohorte offrent des caractéristiques basales en IHC. Nous expliquons cette différence de fréquence par la composition unique des deux cohortes. En ne tenant compte que des carcinomes canauxiaux de haut grade, qui ne présentent ni

récepteurs hormonaux ni amplification de l'oncogène HER-2, nous avons retrouvé des caractéristiques basales dans 60% et 52% des carcinomes étudiées.

Selon les études par profil génétique, les carcinomes à phénotype basal constituent environ 15 à 20% des carcinomes canalaire (tous grades, statuts hormonal et d'HER-2 confondus). 62% des carcinomes canalaire de haut grade expriment des cytokératines basales en IHC d'après les données de Malzahn et collègues [59], et 47% des carcinomes n'exprimant pas de récepteurs hormonaux expriment des marqueurs de cellules myoépithéliales en IHC [84].

Nos données originales sont les seules disponibles actuellement quant à cette entité dans la population du CHUM. Or, on peut déjà conclure que les carcinomes mammaires avec des caractéristiques basales sont des tumeurs fréquentes, et donc, constituent une question non négligeable en pathologie.

Comme le suggèrent les données de la littérature, la plupart des carcinomes qui possèdent des caractéristiques basales sont des carcinomes de haut grade, qui n'expriment ni les récepteurs hormonaux (œstrogène et progestérone) ni ne surexpriment HER-2. C'est pourquoi on emploie le terme « triple négatif » en jargon pathologique. 92% et 90% de nos tumeurs basales sont de phénotype triple négatif, et l'expression des marqueurs basaux utilisés, à l'exception de l'aSMA, est associée à ce phénotype triple négatif d'après nos analyses statistiques.

On pourrait donc en théorie se servir de ce profil d'expression, (les tumeurs de haut grade n'exprimant pas les récepteurs hormonaux ni l'oncogène HER-2) pour rechercher les carcinomes de phénotype basal en pratique clinique.

Il faut cependant tenir compte du fait suivant: environ la moitié des tumeurs dites « triple négatifs » ne présentent pas des caractéristiques basales en IHC. En outre, quelques tumeurs dépourvues de ce profil « triple négatif » peuvent néanmoins comporter des caractéristiques basales.

Nous avons aussi identifié des tumeurs présentant une sur-expression et une amplification de HER-2, et des tumeurs exprimant les récepteurs à progestérone, positifs pour les marqueurs basaux. En conclusion, d'après nos résultats, l'absence de récepteurs des œstrogènes est la seule caractéristique à 100% spécifique des carcinomes basaux, cette caractéristique n'a par contre qu'une faible sensibilité.

Est-ce que les tumeurs avec amplification de HER-2 et/ou des récepteurs de progestérone, positives pour les marqueurs basaux, sont des entités apparentées aux tumeurs ayant un phénotype triple négatif, positives pour ces mêmes marqueurs basaux?

Le profil d'expression génique ne peut pas être toujours entièrement corrélé au profil d'expression par IHC. De plus, le niveau d'activation d'un gène ne prédit pas toujours son expression à l'échelle protéique.

Ceci explique sans doute pourquoi des classes tumorales bien distinctes selon les classifications par profil d'expression génétique se chevauchent dans les études par expression en IHC.

La relation entre le statut HER-2 et les marqueurs basaux n'est donc pas aussi nette que le laissent sous-entendre les études par puces à ADN. 6% et 7% de nos tumeurs basales montrent une sur-expression/amplification l'oncogène HER-2; or 6% et 5% des tumeurs avec surexpression/amplification de HER-2 ont un phénotype basal dans nos deux cohortes.

Nos résultats sont appuyées par certaines données de la littérature: 25% des tumeurs basales identifiées par Kusinska et col. présentent une surexpression de HER-2 [62]; Laakso et col. n'ont pas trouvé de corrélation entre les marqueurs basaux et le statut HER-2 [85]; Tanner et col. suggèrent que la positivité de la CK5 dans les tumeurs avec amplification de HER-2 pourrait indiquer une résistance au traitement par Herceptin [26]. En conclusion, la relation entre les marqueurs basaux et la surexpression du gène HER-2 mérite d'être clarifiée, tout comme la signification de la positivité des marqueurs basaux dans les tumeurs avec amplification de HER-2.

III. CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES CARCINOMES BASAUX

Dans un même ordre d'idées, nos données relatives au profil histopathologique des tumeurs ayant des caractéristiques basales reflètent la difficulté de distinguer

morphologiquement des classes tumorales pourtant clairement distinctes selon le profil génique. Nous avons observé que les carcinomes mammaires positifs pour les marqueurs basaux en IHC se caractérisent morphologiquement par des infiltrats inflammatoires denses, des foyers de nécrose tumorale, et par une réaction stromale desmoplastique bien développée. Livasy et col. ont aussi noté l'association du carcinome basal à des infiltrats lymphocytaires et des foyers de nécrose [82]. Les données de Tsuda et col vont dans le même sens, associant les carcinomes canauxaux pourvus de grandes zones acellulaires centrales aux carcinomes à différenciation myoépithéliale [86, 87]. Tout de même, d'après nos propres résultats et ceux de la littérature, ces caractéristiques morphologiques semblent être associées aux tumeurs qui n'expriment pas les récepteurs hormonaux [88], et notamment aussi aux tumeurs qui sur-expriment l'oncogène HER-2 [82]. Des études complémentaires comportant un plus grand nombre de tumeurs sont nécessaires pour mieux déterminer la spécificité et la sensibilité des différents critères morphologiques, et pour déterminer, si, au sein des tumeurs qui n'expriment pas les récepteurs hormonaux, certaines classes histologiques sont aptes à distinguer entre eux les carcinomes basaux, les carcinomes sur-exprimant l'oncogène HER-2, et les carcinomes négatifs pour tous ces marqueurs. Pour le moment, il nous semble que le seul aspect histologique de la tumeur, ne permette pas de poser avec certitude le diagnostic de carcinome basal, ce qui expliquerait entre autres, pourquoi ce type de carcinome est à peu près passé inaperçu jusqu'à tout récemment.

IV. SPECTRE LESIONNEL DES CARCINOMES BASAUX

D'après nos analyses statistiques, il existe une association positive entre l'expression coordonnée de tous les marqueurs basaux, sauf pour l'expression de la CK14 et de l'aSMA.

D'après nos résultats, le marqueur le plus sensible pour identifier les carcinomes basaux est la CK5; elle est exprimée dans 41% de toutes nos tumeurs et dans 81% de toutes les tumeurs basales (deuxième cohorte). Des sept tumeurs avec phénotype basal qui ne marquent pas pour la CK5, trois ont marqué pour l'EGFR, deux pour la CK17, une pour l'EGFR et la CK17, et une pour l'aSMA. En conclusion, la CK14 est le seul marqueur qui n'a pas permis d'identifier de carcinomes avec phénotype basal autres que ceux déjà confirmés par le marquage pour la CK5.

Par ailleurs, le marquage en IHC sur des coupes sériées nous a permis de confirmer qu'au sein d'une même tumeur, ce sont les mêmes populations cellulaires qui expriment généralement les divers marqueurs basaux, sauf pour certains cas, où l'expression de l'aSMA s'est vue au sein de régions tumorales distinctes des régions exprimant les CK basales et HER1.

Dans la pratique clinique courante, à cause des impératifs budgétaires, il n'est pas toujours possible de vérifier l'expression de plusieurs antigènes pour chaque

tumeur. Dans ce cas, on pourrait suggérer de n'utiliser que la CK5, qui identifie la majorité des tumeurs avec des caractéristiques basales.

Mais, peut-on vraiment apprécier tout le spectre lésionnel à l'aide d'un seul anticorps?

Comme le supposait notre hypothèse de travail, les tumeurs ayant des caractéristiques basales/myoépithéliales représentent un groupe hétérogène de tumeurs. Le spectre lésionnel de ces entités pathologiques est beaucoup plus vaste que celui reflété par la littérature.

Bien que nous ayons identifié des tumeurs marquant de façon diffuse pour tous les marqueurs basaux (ex. 30), nous avons aussi identifié plusieurs tumeurs qui ne marquent que pour l'un ou deux des marqueurs, et ceci de façon très focale (ex cas 33, qui marque uniquement et de façon focale pour la CK5 sans marquage pour les autres marqueurs basaux; ou le cas 29, qui ne marque que pour l'aSMA). Par ailleurs la combinaison de marqueurs basaux exprimés varie d'une tumeur à l'autre, et qui plus est, la co-expression des marqueurs luminaux et des marqueurs basaux varie aussi d'une lésion à l'autre. Par exemple, le cas 15 co-exprime les marqueurs basaux et deux des marqueurs luminaux dans la même région; alors que le cas 11, positif pour quatre marqueurs basaux, n'exprime pas les marqueurs luminaux.

Plusieurs questions découlent de nos résultats. Notre principale considération est de déterminer si l'hétérogénéité des résultats en IHC est le reflet d'un large spectre

lésionnel traduisant différentes origines tumorales, et une pertinence clinique inégale.

En ce qui concerne le marquage, parfois focal, parfois global, des marqueurs basaux, il faudrait déterminer si l'agressivité des tumeurs de phénotype basal, identifiées par les études par puces à ADN, peut être conférée par seulement quelques cellules identifiées par IHC. Faudrait-il considérer sur le même plan des lésions tumorales entièrement composées de cellules positives pour les marqueurs basaux, et des lésions n'ayant qu'une composante basale minoritaire?

Le cancer du sein est l'un des carcinomes le plus hétérogènes que l'on connaisse. Même si à l'origine le cancer est souvent monoclonal, avec le temps les lésions se diversifient en sous-clones distincts. L'agressivité du cancer ne reflète pas forcément le comportement biologique de la composante majoritaire de la tumeur. Il suffit qu'un sous-clone soit doté de pouvoirs de résistance à la chimiothérapie pour que le traitement échoue. En effet, cette population tumorale minoritaire survivra au traitement de chimiothérapie et, après quelques divisions mitotiques, la tumeur aura repris sa taille originale. Il en est de même pour l'invasion et la métastase: même si la majorité des cellules tumorales ne possèdent pas des capacités métastatiques, il suffit de quelques cellules capables de migrer et proliférer dans un autre organe pour former un foyer tumoral secondaire.

Est-ce que dans ce cas, une tumeur n'ayant qu'un petit foyer de cellules tumorales exprimant un seul marqueur basal peut être aussi, sinon plus agressive, qu'une tumeur globalement positive pour tous les marqueurs basaux? Quelle est le seuil

inférieur nécessaire, en termes de nombre de cellules cancéreuses de phénotype basal, pour considérer qu'une tumeur correspond à un "carcinome basal"? Les études par IHC semblent plus adéquates que les études par profil génétique pour aborder ces questions. Il n'y a actuellement aucune étude publiée ayant corrélié le système d'évaluation du marquage des marqueurs basaux en IHC aux *endpoints* pronostiques.

V. ORIGINE DES CARCINOMES BASAUX

Compte tenu de la combinatoire complexe des marqueurs basaux qui varie d'une tumeur à l'autre, plusieurs réflexions s'imposent tant au plan fondamental que au plan clinique. Au plan fondamental, nos résultats soulèvent plusieurs possibilités quant à l'origine histo- génétique de ces tumeurs. En analysant uniquement les tumeurs ayant un phénotype purement basal, on pourrait supposer qu'il s'agit des tumeurs composées exclusivement de cellules myoépithéliales. D'après les données de la littérature et selon nos propres observations sur les tissus mammaires normaux de contrôle, les marqueurs basaux que nous avons utilisés ont tous marqué les cellules myoépithéliales du sein normal [28, 29, 89]. Par ailleurs, ces marqueurs se retrouvent aussi dans les rares cas de carcinomes myoépithéliaux [43, 45, 47, 48, 58].

Les quelques données de la littérature concernant les carcinomes myoépithéliaux confirment à première vue le lien entre ces entités. Les carcinomes myoépithéliaux tout comme les carcinomes basaux n'expriment pas les récepteurs hormonaux, leur pronostic est sombre, et ils semblent être résistants aux agents thérapeutiques

actuels [46, 50, 51, 90, 91]. Par ailleurs, des données obtenues par hybridation comparative génomique suggèrent que le profil d'anomalies cytogénétiques des carcinomes canauxaux avec phénotype basal correspond au profil d'anomalies cytogénétiques retrouvé dans les carcinomes myoépithéliaux conventionnels [92]. Une étude ayant analysé par microscopie électronique des carcinomes canauxaux exprimant la CK14 et l'aSMA a confirmé la différenciation myoépithéliale des cellules cancéreuses [86]. Actuellement, il n'y a pas de données quant aux caractéristiques ultrastructurales des carcinomes basaux identifiés par les puces à ADN.

Même s'il semble évident d'impliquer comme principale protagoniste la cellule myoépithéliale, nos propres données et les résultats de la littérature récente nous forcent à considérer d'autres types cellulaires potentiels dans la genèse des carcinomes mammaires de phénotype basal.

Pour commencer, beaucoup de nos tumeurs basales co-expriment les marqueurs luminaux EMA et CK19. Les données de la littérature quant à l'expression conjointe de marqueurs luminaux et basaux restent contradictoires. Pour certains auteurs le type d'expression des CK serait exclusivement soit de type luminal, soit de type basal selon la tumeur [93]; pour d'autres équipes, l'expression d'un seul type de CK serait peu fréquente, la majorité des tumeurs expriment les deux classes de CK [57, 59]. Mais ce qui semble assuré c'est que les CK lumineuses et l'EMA n'ont jamais été retrouvés dans les cellules myoépithéliales/ basales[29].

Par ailleurs, une question additionnelle se rajoute: apparemment, bien que le profil d'expression des CK basales (CK 5, 14 et 17) soit caractéristique des cellules basales/myoépithéliales, il semble qu'il ne soit pas exclusif à ce type de cellules. En effet quelques publications démontrent l'expression de ces marqueurs dans les cellules luminales des gros canaux mammaires et des portions terminales des canaux galactophores [59, 93, 94]. Le phénotype basal pourrait donc être relié non aux cellules de la couche basale, mais à une sous-population de cellules luminales exprimant les cytokératines basales. Ceci pourrait expliquer nos résultats à l'effet que l'expression de l'aSMA (jamais identifié comme marqueur luminal) ne soit pas corrélée à l'expression de certains de nos autres marqueurs basaux (comme la CK14); ceci pourrait expliquer pourquoi, dans certaines tumeurs, l'expression de l'aSMA ne concerne pas les mêmes cellules qui expriment les cytokératines basales; enfin ceci pourrait aussi expliquer pourquoi l'aSMA est si peu souvent exprimée dans les tumeurs basales. On pourrait envisager par ailleurs un certain degré de métaplasie ou d'expression aberrante de marqueurs myoépithéliaux par ces cellules, pour expliquer l'expression concomitante d'autres marqueurs myoépithéliaux dans ces carcinomes comme l'aSMA, par exemple.

Des données récentes suggèrent l'existence, dans le sein humain, de cellules souches ou progénitrices des cellules épithéliales (donc des cellules progénitrices communes aux cellules luminales et myoépithéliales). Ces cellules seraient localisées dans la couche basale, parmi les cellules myoépithéliales [84, 94-97]. Leur profil d'expression protéique et génique n'est toujours pas documenté, et

actuellement, il est difficile de savoir si certains des marqueurs attribués aux cellules myoépithéliales sont aussi, sinon davantage, exprimés dans les cellules progénitrices. Du reste, certains auteurs prétendent que certains des marqueurs basaux, comme la CK5, la CK14, et la p63 sont des marqueurs spécifiques des cellules souches/progénitrices du sein [64, 66, 85, 97]. Dans ce contexte, les cellules progénitrices pourraient être à l'origine des carcinomes basaux.

En conclusion, il est essentiel de mieux caractériser les populations des cellules mammaires pour arriver à un consensus quant aux profils d'expression protéique et génique de ces cellules; ce n'est qu'à ce moment que l'on pourra espérer comprendre l'origine des carcinomes mammaires.

Par ailleurs, il faut garder à l'esprit que les carcinomes de phénotype basal pourraient aussi constituer un vaste groupe de carcinomes ayant une origine distincte comme par exemple :

- 1- Des carcinomes provenant de cellules myoépithéliales (ex cas 11), où les marqueurs basaux sont exprimés, sans expression concomitante des marqueurs des cellules luminales.
- 2- Des carcinomes provenant des cellules luminales (exprimant ou non à leur état physiologique les CK basales) adoptant le profil des cellules myoépithéliales lors de la transformation néoplasique, et leur conférant un avantage au plan de la survie et de l'agressivité. Dans ce

cas, les marqueurs des cellules luminales sont aussi exprimés. (Ex cas 15).

- 3- Des carcinomes provenant de cellules progénitrices, ou de cellules à différenciation intermédiaire. C'est à dire, pouvant exprimer à la fois, les marqueurs des cellules basales et des cellules luminales à l'état physiologique, et se différenciant, tant à l'état physiologique que lors du processus de cancérisation, en cellules myoépithéliales et luminales. Ceci pourrait expliquer l'existence de tumeurs (comme dans le cas 1), où l'on retrouve dans une même tumeur des populations avec un marquage purement luminal, et d'autres avec un marquage purement myoépithélial.

VI. SIGNIFICATION CLINIQUE DES MARQUEURS BASaux

Du côté clinique, l'essentiel est de connaître la signification au plan pronostique et thérapeutique des marqueurs basaux. Est-ce que l'expression des CK basales est un facteur de mauvais pronostic, un indicateur de résistance/sensibilité thérapeutique, en soi, indépendamment du type cellulaire qui les exprime? Ce profil est-il un facteur de mauvais pronostic, de résistance/sensibilité thérapeutique dans le cas où il reflète un type cellulaire spécifique, comme par exemple, les cellules myoépithéliales ou progénitrices? La valeur pronostique des différents marqueurs n'a pas été clairement établie dans la littérature: bien que

l'équipe de Van den Rijn corrèle l'expression des CK5 et 17 à un mauvais pronostic dans les tumeurs sans atteinte ganglionnaire [63], les données de Potemski et col. suggèrent que le mauvais pronostic associé aux tumeurs de phénotype basal n'est pas associé à l'expression des CK basales, mais plutôt à l'absence de récepteurs hormonaux et à l'expression d'autres marqueurs comme la cycline E [98].

Il est donc nécessaire d'évaluer la valeur pronostique de chaque marqueur basal dans chaque type de carcinome basal. Le même raisonnement s'applique pour les marqueurs ayant un intérêt thérapeutique. Par exemple, il est essentiel de savoir si tous les carcinomes exprimant les CK basales, ou l'EGFR, indépendamment du type cellulaire qui exprime ces protéines, représentent un groupe de carcinomes ayant une même sensibilité à un type de chimiothérapie spécifique et une même réponse aux médicaments inhibiteurs d'EGFR (actuellement en phase d'étude). Parallèlement on peut se demander si la sensibilité est dépendante de l'origine cellulaire exprimant le marqueur, plutôt que du marqueur en lui même.

Les implications thérapeutiques de reconnaître le rôle des cellules souches dans le processus de carcinogenèse sont majeures. Le principe de la chimiothérapie actuelle est fondé sur l'action des agents sur les cellules qui prolifèrent rapidement. Il n'y a actuellement aucune stratégie thérapeutique dirigée contre les cellules quiescentes ou faiblement prolifératives (comme les cellules souches et

progénitrices) mais capables d'initier une population tumorale, et d'envahir des tissus.

VII.LA TOPOISOMERASE 2A DANS LE CARCINOME DE PHENOTYPE BASAL

L'identification de nouvelles classes tumorales offre un grand intérêt si elle permet aussi d'ouvrir de nouvelles possibilités thérapeutiques spécifiques surtout pour les nouvelles classes.

C'est dans cette perspective qu'il nous a semblé pertinent d'étudier le statut de la topoisomérase dans les tumeurs basales.

Actuellement il n'y a pas de critères validés permettant de prédire la réponse à la chimiothérapie pour une tumeur donnée. D'après les données de la littérature récente, la topoisomérase semble un marqueur potentiel pour prédire la réponse aux anthracyclines. Il semble que les tumeurs présentant une amplification du gène de la topoisomérase 2A sont plus susceptibles à répondre à ce type de chimiothérapie [19-21]. Les anthracyclines sont parmi les agents les plus utilisés pour la chimiothérapie adjuvante et néoadjuvante du cancer du sein. Par ailleurs, il semble que les carcinomes basaux identifiés par les puces à ADN, soient plus sensibles à la chimiothérapie néoadjuvante à base d'anthracyclines que les carcinomes qui expriment les récepteurs hormonaux. [70]. Ces données sont encore préliminaires et nécessitent des études supplémentaires. A ce jour, le spectre de sensibilité des carcinomes basaux aux divers agents chimiothérapeutiques est inconnu. Bien que les données dans la littérature

indiquent que l'amplification du gène de la topoisomérase est presque toujours accompagné d'une amplification du gène HER-2 [19], certaines études indiquent, que, dans certains cas, (de 2 à 10% des cas), l'amplification de la topoisomérase ne suit pas toujours à une amplification de HER-2 [20]. Par ailleurs, le gène de la topoisomérase 2A est un des gènes identifiés dans le profil d'expression des carcinomes mammaires de phénotype basal par l'équipe de Sotiriou et col.[69].

Actuellement il n'y a pas de données publiées concernant le statut de la topoisomérase 2A par FISH ou par IHC dans les carcinomes basaux.

Selon nos résultats les carcinomes basaux ne sont pas associés à une amplification de la topoisomérase 2A, nous n'avons donc aucune raison de croire à une sensibilité particulière des tumeurs de type basal aux anthracyclines.

VIII. LES MMT ET L'ETUDE DES CARCINOMES MAMMAIRES

Pour terminer, je voudrais discuter de la technique des micromatrices tissulaires ("MMT") pour l'étude des carcinomes mammaires.

Les micromatrices tissulaires ouvrent des nouvelles perspectives en pathologie. Leur principal potentiel est de permettre l'étude à haut débit de plusieurs spécimens simultanément. Comme les mêmes conditions de traitement sont appliquées à tous les spécimens, les résultats demeurent comparables d'une tumeur à l'autre.

Les micromatrices sont notamment utiles pour la validation des études par profil génétique, et pour l'étude et la caractérisation des nouvelles classes tumorales. Il s'agit d'un procédé économique et efficace.

Le cancer, et particulièrement le cancer du sein, est une maladie très hétérogène.

Nos résultats indiquent que le carcinome du sein de type basal l'est tout autant.

Dans notre étude, nous avons dû nous assurer que dans quelques carottes millimétriques, cette hétérogénéité était bien reflétée. A notre avis, le dessin expérimental de notre micromatrice nous semble pertinent: trois carottes de 1mm de diamètre ont été incluses par micromatrice. En considérant que jusqu'à un tiers de carottes peuvent se décoller du bloc lors de la confection des lames, et que certaines tumeurs marquent de façon très focale pour certains marqueurs, l'inclusion de trois carottes par cas nous a semblée nécessaire.

La recherche des carcinomes basaux s'est faite dans la première cohorte par le marquage conventionnel en IHC de la lame tumorale au complet, et dans la deuxième cohorte, par le marquage des micromatrices. Si nous comparons l'incidence de carcinomes basaux parmi les tumeurs de haut grade ayant un phénotype triple négatif des deux cohortes, les résultats sont comparables.

Evidement, pour évaluer rigoureusement le dessin expérimental de la micromatrice, nous devrions réaliser, en parallèle, des marquages conventionnels sur l'intégralité des lames tumorales incluses dans la micromatrice et vérifier si des nouveaux cas de carcinomes basal sont identifiés.

La sub-division de micromatrices et sub-micromatrices avec des tissus de contrôle nous a grandement facilité le repérage des cas.

Nos micromatrices tissulaires nous ont permis en outre d'analyser les niveaux d'amplification génique par FISH du gène HER2 et du gène de la topoisomérase 2A.

Il existe plusieurs méthodes pour détecter le statut de HER2 dans les cellules tumorales: détection du nombre de copies du gène par Southern Blot et FISH, mesures quantitatives du taux de transcription ou de traduction par Northern Blot et Western Blot, détection semi quantitative de la protéine par immunohistochimie [12, 99].

Il n'y a toujours pas de consensus quant à la meilleure méthode pour déterminer le statut HER-2 d'un patient. L'immunohistochimie est la méthode de choix dans beaucoup d'hôpitaux. Certaines publications soutiennent son rôle dans les cas occasionnels ou la surexpression est indépendante de l'amplification génique. Ces cas ne sont pas détectés par FISH.

C'est pourquoi 6% de nos tumeurs ayant une sur-expression en IHC n'ont pas montré d'amplification par FISH.

Par contre, beaucoup de publications récentes indiquent que la détection de l'amplification par FISH permet de mieux prédire la réponse au Trastuzumab. De

plus, certaines amplifications géniques ne s'accompagnent pas de sur-expression par IHC. Dans notre cohorte, 5% des cas amplifiés n'ont pas été détectés par IHC. Dans ce cas, même si la détection par FISH est plus coûteuse que la détection par l'immunohistochimie, elle pourrait être plus rentable pour la prise en charge globale du patient.

L'utilisation des micromatrices tissulaires en pratique clinique permettrait de réduire davantage le coût du FISH en réduisant les besoins en réactifs coûteux.

A ce jour, l'utilisation de la technique FISH pour la caractérisation du gène de la topoisomérase 2A sur des micromatrices tissulaires n'a pas encore été rapportée.

Il nous a paru difficile d'optimiser le protocole pour l'ensemble des carottes au sein d'une même micromatrice. Probablement, en raison de la variation des différentes carottes, il est malaisé d'optimiser les résultats pour toutes les carottes à la fois. Quoi qu'il en soit, nous avons montré l'efficacité de la technique FISH sur les MMT pour détecter l'amplification du gène HER-2. Il nous reste donc à optimiser notre protocole de FISH pour la topoisomérase.

En conclusion, la technique des micromatrices tissulaires nous semble une technique avantageuse pour l'étude des carcinomes basaux.

Nous croyons que la recherche systématique des carcinomes mammaires avec des caractéristiques basales devrait être encouragée en clinique. Bien qu'à ce jour nous

ne sachions pas comment traiter ces carcinomes, ce n'est qu'en accumulant des données probantes sur cette maladie que nous pourrons progresser dans la prise en charge des femmes atteintes de cette entité.

Les analyses actuelles des carcinomes mammaires en pratique clinique courante (morphologie et statut des récepteurs hormonaux et de HER-2) ne permettent pas d'identifier les carcinomes ayant des caractéristiques basales. L'utilisation des micromatrices pourrait constituer un moyen économique et efficace pour rechercher l'expression par IHC de nouveaux marqueurs et permettre d'identifier au plan clinique ces entités pathologiques souvent agressives.

BIBLIOGRAPHIE

1. Robbins and Cotran. **Pathologic basis of disease**. 7th edition, 2005.
2. Pike MC: **Age-related factors in cancers of the breast, ovary, and endometrium**. *J Chronic Dis* 1987, **40 Suppl 2**:59S-69S.
3. Pike MC, Kolonel LN, Henderson BE, Wilkens LR, Hankin JH, Feigelson HS, Wan PC, Stram DO, Nomura AM: **Breast cancer in a multiethnic cohort in Hawaii and Los Angeles: risk factor-adjusted incidence in Japanese equals and in Hawaiians exceeds that in whites**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, **11**(9):795-800.
4. Pike MC, Pearce CL, Wu AH: **Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary**. *Oncogene* 2004, **23**(38):6379-6391.
5. Pike MC, Spicer DV, Dahmouch L, Press MF: **Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk**. *Epidemiol Rev* 1993, **15**(1):17-35.
6. Nagle RB, Bocker W, Davis JR, Heid HW, Kaufmann M, Lucas DO, Jarasch ED: **Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells**. *J Histochem Cytochem* 1986, **34**(7):869-881.
7. Senn HJ, Thurlimann B, Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS: **Comments on the St. Gallen Consensus 2003 on the Primary Therapy of Early Breast Cancer**. *Breast* 2003, **12**(6):569-582.

8. Ross JS, Schenkein DP, Pietrusko R, Rolfe M, Linette GP, Stec J, Stagliano NE, Ginsburg GS, Symmans WF, Puztai L *et al*: **Targeted therapies for cancer 2004**. *Am J Clin Pathol* 2004, **122**(4):598-609.
9. Hudziak RM, Schlessinger J, Ullrich A: **Increased expression of the putative growth factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987, **84**(20):7159-7163.
10. Guy CT, Webster MA, Schaller M, Parsons TJ, Cardiff RD, Muller WJ: **Expression of the neu protooncogene in the mammary epithelium of transgenic mice induces metastatic disease**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, **89**(22):10578-10582.
11. Roskoski R, Jr.: **The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer**. *Biochem Biophys Res Commun* 2004, **319**(1):1-11.
12. Ross JS, Fletcher JA, Linette GP, Stec J, Clark E, Ayers M, Symmans WF, Puztai L, Bloom KJ: **The Her-2/neu gene and protein in breast cancer 2003: biomarker and target of therapy**. *Oncologist* 2003, **8**(4):307-325.
13. Mendelsohn J, Baselga J: **The EGF receptor family as targets for cancer therapy**. *Oncogene* 2000, **19**(56):6550-6565.
14. Smith BL, Chin D, Maltzman W, Crosby K, Hortobagyi GN, Bacus SS: **The efficacy of Herceptin therapies is influenced by the expression of other erbB receptors, their ligands and the activation of downstream signalling proteins**. *Br J Cancer* 2004, **91**(6):1190-1194.

15. Barrett-Lee PJ: **Growth factor signalling in clinical breast cancer and its impact on response to conventional therapies: a review of chemotherapy.** *Endocr Relat Cancer* 2005, **12 Suppl 1**:S125-133.
16. Nabholz JM, Slamon D: **New adjuvant strategies for breast cancer: meeting the challenge of integrating chemotherapy and trastuzumab (Herceptin).** *Semin Oncol* 2001, **28**(1 Suppl 3):1-12.
17. Depowski PL, Rosenthal SI, Brien TP, Stylos S, Johnson RL, Ross JS: **Topoisomerase IIalpha expression in breast cancer: correlation with outcome variables.** *Mod Pathol* 2000, **13**(5):542-547.
18. Durbecq V, Desmed C, Paesmans M, Cardoso F, Di Leo A, Mano M, Rouas G, Leroy JY, Sotiriou C, Piccart M *et al*: **Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer.** *Int J Oncol* 2004, **25**(5):1473-1479.
19. Bonadonna G, Valagussa P, Brambilla C, Ferrari L, Moliterni A, Terenziani M, Zambetti M: **Primary chemotherapy in operable breast cancer: eight-year experience at the Milan Cancer Institute.** *J Clin Oncol* 1998, **16**(1):93-100.
20. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A *et al*: **Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer.** *Science* 1989, **244**(4905):707-712.

21. Buzdar AU: **Topoisomerase IIalpha gene amplification and response to anthracycline-containing adjuvant chemotherapy in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(16):2409-2411.
22. Kalogeraki A, Ieromonachou P, Kafousi M, Giannikaki E, Vrekoussis T, Zoras O, Tsiftsis D, Delides G, Stathopoulos E: **Topoisomerase II alpha expression in breast ductal invasive carcinomas and correlation with clinicopathological variables.** *In Vivo* 2005, **19**(5):837-840.
23. Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H, Friese K: **Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(6):R1174-1185.
24. Hicks DG, Yoder BJ, Pettay J, Swain E, Tarr S, Hartke M, Skacel M, Crowe JP, Budd GT, Tubbs RR: **The incidence of topoisomerase II-alpha genomic alterations in adenocarcinoma of the breast and their relationship to human epidermal growth factor receptor-2 gene amplification: a fluorescence in situ hybridization study.** *Hum Pathol* 2005, **36**(4):348-356.
25. Jarvinen TA, Liu ET: **HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in breast cancer.** *Breast Cancer Res Treat* 2003, **78**(3):299-311.
26. Tanner M, Isola J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, Malmstrom P, Wilking N, Nilsson J, Bergh J: **Topoisomerase IIalpha gene amplification predicts favorable treatment response to tailored**

- and dose-escalated anthracycline-based adjuvant chemotherapy in HER-2/neu-amplified breast cancer: Scandinavian Breast Group Trial 9401.** *J Clin Oncol* 2006, **24**(16):2428-2436.
27. Jolicoeur F: **Intrauterine breast development and the mammary myoepithelial lineage.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005, **10**(3):199-210.
 28. Deugnier MA, Teuliere J, Faraldo MM, Thiery JP, Glukhova MA: **The importance of being a myoepithelial cell.** *Breast Cancer Res* 2002, **4**(6):224-230.
 29. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T: **Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2005, **7**(4):143-148.
 30. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT: **Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue.** *Breast Cancer Res Treat* 2001, **67**(2):93-109.
 31. Smith GH, Chepko G: **Mammary epithelial stem cells.** *Microsc Res Tech* 2001, **52**(2):190-203.
 32. Chepko G, Smith GH: **Mammary epithelial stem cells: our current understanding.** *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999, **4**(1):35-52.
 33. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA *et al*: **Molecular portraits of human breast tumours.** *Nature* 2000, **406**(6797):747-752.

34. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: **The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells.** *Cell* 1982, **31**(1):11-24.
35. Ahmed A: **The myoepithelium in human breast fibroadenoma.** *J Pathol* 1974, **114**(3):135-138.
36. Gugliotta P, Sapino A, Macri L, Skalli O, Gabbiani G, Bussolati G: **Specific demonstration of myoepithelial cells by anti-alpha smooth muscle actin antibody.** *J Histochem Cytochem* 1988, **36**(6):659-663.
37. Azzopardi JG, Ahmed A, Millis RR: **Problems in breast pathology.** *Major Probl Pathol* 1979, **11**:i-xvi, 1-466.
38. Chu P, Arber DA: **Paraffin-section detection of CD10 in 505 nonhematopoietic neoplasms. Frequent expression in renal cell carcinoma and endometrial stromal sarcoma.** *Am J Clin Pathol* 2000, **113**(3):374-382.
39. Lazard D, Sastre X, Frid MG, Glukhova MA, Thiery JP, Koteliansky VE: **Expression of smooth muscle-specific proteins in myoepithelium and stromal myofibroblasts of normal and malignant human breast tissue.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993, **90**(3):999-1003.
40. Kahn HJ, Marks A, Thom H, Baumal R: **Role of antibody to S100 protein in diagnostic pathology.** *Am J Clin Pathol* 1983, **79**(3):341-347.
41. Page MJ, Amess B, Townsend RR, Parekh R, Herath A, Brusten L, Zvelebil MJ, Stein RC, Waterfield MD, Davies SC *et al*: **Proteomic**

- definition of normal human luminal and myoepithelial breast cells purified from reduction mammoplasties.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**(22):12589-12594.
42. Foschini MP, Eusebi V: **Carcinomas of the breast showing myoepithelial cell differentiation. A review of the literature.** *Virchows Arch* 1998, **432**(4):303-310.
43. Trendell-Smith NJ, Peston D, Shousha S: **Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins.** *Histopathology* 1999, **35**(3):241-248.
44. Tavassoli FA: **Myoepithelial lesions of the breast. Myoepitheliosis, adenomyoepithelioma, and myoepithelial carcinoma.** *Am J Surg Pathol* 1991, **15**(6):554-568.
45. Damiani S, Riccioni L, Pasquinelli G, Eusebi V: **Poorly differentiated myoepithelial cell rich carcinoma of the breast.** *Histopathology* 1997, **30**(6):542-548.
46. Jolicoeur F, Seemayer TA, Gabbiani G, Robidoux A, Gaboury L, Oligny LL, Schurch W: **Multifocal, nascent, and invasive myoepithelial carcinoma (malignant myoepithelioma) of the breast: an immunohistochemical and ultrastructural study.** *Int J Surg Pathol* 2002, **10**(4):281-291.

47. Thorner PS, Kahn HJ, Bauman R, Lee K, Moffatt W: **Malignant myoepithelioma of the breast. An immunohistochemical study by light and electron microscopy.** *Cancer* 1986, **57**(4):745-750.
48. Jones C, Foschini MP, Chaggar R, Lu YJ, Wells D, Shipley JM, Eusebi V, Lakhani SR: **Comparative genomic hybridization analysis of myoepithelial carcinoma of the breast.** *Lab Invest* 2000, **80**(6):831-836.
49. Trojani M, Guiu M, Trouette H, De Mascarel I, Cocquet M: **Malignant adenomyoepithelioma of the breast. An immunohistochemical, cytophotometric, and ultrastructural study of a case with lung metastases.** *Am J Clin Pathol* 1992, **98**(6):598-602.
50. Simpson RH, Cope N, Skalova A, Michal M: **Malignant adenomyoepithelioma of the breast with mixed osteogenic, spindle cell, and carcinomatous differentiation.** *Am J Surg Pathol* 1998, **22**(5):631-636.
51. Schurch W, Potvin C, Seemayer TA: **Malignant myoepithelioma (myoepithelial carcinoma) of the breast: an ultrastructural and immunocytochemical study.** *Ultrastruct Pathol* 1985, **8**(1):1-11.
52. Ghosh L: **Ultrastructural study of myoepithelial cells in breast carcinoma.** *J Surg Oncol* 1980, **15**(1):19-28.
53. Sarkar K, Kallenbach E: **Myoepithelial cells in carcinoma of human breast.** *Am J Pathol* 1966, **49**(2):301-307.

54. Hayashi Y, Aoki Y, Eto R, Tokuoka S: **Findings of myoepithelial cells in human breast cancer. Ultrastructural and immunohistochemical study by means of anti-myosin antibody.** *Acta Pathol Jpn* 1984, **34**(3):537-552.
55. Tsuchiya S, Li F: **Electron microscopic findings for diagnosis of breast lesions.** *Med Mol Morphol* 2005, **38**(4):216-224.
56. Palacios J, Benito N, Pizarro A, Suarez A, Espada J, Cano A, Gamallo C: **Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features.** *Am J Pathol* 1995, **146**(3):605-612.
57. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, Nicholson RI, Ellis IO: **Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma.** *J Pathol* 2004, **203**(2):661-671.
58. Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, Pileri S, Marrano D: **Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression.** *J Pathol* 1996, **179**(4):386-391.
59. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R: **Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas.** *Virchows Arch* 1998, **433**(2):119-129.
60. Reis-Filho JS, Milanezi F, Amendoeira I, Albergaria A, Schmitt FC: **Distribution of p63, a novel myoepithelial marker, in fine-needle**

- aspiration biopsies of the breast: an analysis of 82 samples.** *Cancer* 2003, **99**(3):172-179.
61. Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, Begin LR, Wong N, Chappuis PO, Akslen LA, Foulkes WD: **Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer.** *Clin Cancer Res* 2005, **11**(11):4003-4011.
 62. Kusinska R, Potemski P, Jesionek-Kupnicka D, Kordek R: **Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma--relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2.** *Pol J Pathol* 2005, **56**(3):107-110.
 63. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, Torhorst J, Sauter G, Zuber M, Kochli OR *et al*: **Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome.** *Am J Pathol* 2002, **161**(6):1991-1996.
 64. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandao DF, Chahud F, Zucoloto S: **p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer.** *Histopathology* 2005, **47**(5):458-466.
 65. Foulkes WD, Brunet JS, Stefansson IM, Straume O, Chappuis PO, Begin LR, Hamel N, Goffin JR, Wong N, Trudel M *et al*: **The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-**

- microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer.** *Cancer Res* 2004, **64**(3):830-835.
66. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, van Diest PJ, Brandt B, Boecker W, Buerger H: **Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis.** *Lab Invest* 2002, **82**(11):1525-1533.
 67. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L *et al*: **Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(16):5367-5374.
 68. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS *et al*: **Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, **98**(19):10869-10874.
 69. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, Martiat P, Fox SB, Harris AL, Liu ET: **Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(18):10393-10398.
 70. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, Hess KR, Stec J, Ayers M, Wagner P *et al*: **Breast cancer**

molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy.

Clin Cancer Res 2005, **11**(16):5678-5685.

71. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: **Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens.** *Nat Med* 1998, **4**(7):844-847.
72. Jacquemier J, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Bege T, Geneix J, Birnbaum D: **[Small but high throughput: how "tissue-microarrays" became a favorite tool for pathologists and scientists].** *Ann Pathol* 2003, **23**(6):623-632.
73. Bertucci F, Houlgatte R, Nguyen C, Viens P, Jordan BR, Birnbaum D: **Gene expression profiling of cancer by use of DNA arrays: how far from the clinic?** *Lancet Oncol* 2001, **2**(11):674-682.
74. Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES: **Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer.** *Mod Pathol* 2003, **16**(1):79-84.
75. Zhang DH, Salto-Tellez M, Chiu LL, Shen L, Koay ES: **Tissue microarray study for classification of breast tumours.** *Ann Acad Med Singapore* 2003, **32**(5 Suppl):S75-76.
76. Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, Eisinger F, Geneix J, Bechlian D, Conte N, Adelaide J, Toiron Y, Nguyen C *et al*: **Distinct and complementary information provided by use of tissue and DNA**

- microarrays in the study of breast tumor markers.** *Am J Pathol* 2002, **161**(4):1223-1233.
77. Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HR: **Tissue microarrays: a current medical research tool.** *Curr Med Res Opin* 2004, **20**(5):707-712.
 78. Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H: **Demystified.tissue microarray technology.** *Mol Pathol* 2003, **56**(4):198-204.
 79. Camp RL, Charette LA, Rimm DL: **Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma.** *Lab Invest* 2000, **80**(12):1943-1949.
 80. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, Kuo D, Brennan MF, Lewis JJ, Cordon-Cardo C: **Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors.** *Am J Pathol* 2001, **158**(4):1245-1251.
 81. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S *et al*: **Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, **100**(14):8418-8423.
 82. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM: **Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.** *Mod Pathol* 2006, **19**(2):264-271.

83. Wetzels RH, Holland R, van Haelst UJ, Lane EB, Leigh IM, Ramaekers FC: **Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast.** *Am J Pathol* 1989, **134**(3):571-579.
84. Kesse-Adu R, Shousha S: **Myoepithelial markers are expressed in at least 29% of oestrogen receptor negative invasive breast carcinoma.** *Mod Pathol* 2004, **17**(6):646-652.
85. Laakso M, Loman N, Borg A, Isola J: **Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors.** *Mod Pathol* 2005, **18**(10):1321-1328.
86. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Hirohashi S: **Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases.** *Am J Surg Pathol* 2000, **24**(2):197-202.
87. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa T, Murata T, Hirohashi S: **Myoepithelial differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones.** *Hum Pathol* 1999, **30**(10):1134-1139.
88. Putti TC, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AH, Pinder SE, Ellis IO: **Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis.** *Mod Pathol* 2005, **18**(1):26-35.

89. Gusterson BA, Warburton MJ, Mitchell D, Ellison M, Neville AM, Rudland PS: **Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast diseases.** *Cancer Res* 1982, **42**(11):4763-4770.
90. Kiaer H, Nielsen B, Paulsen S, Sorensen IM, Dyreborg U, Blichert-Toft M: **Adenomyoepithelial adenosis and low-grade malignant adenomyoepithelioma of the breast.** *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1984, **405**(1):55-67.
91. Lakhani SR, O'Hare MJ, Monaghan P, Winehouse J, Gazet JC, Sloane JP: **Malignant myoepithelioma (myoepithelial carcinoma) of the breast: a detailed cytokeratin study.** *J Clin Pathol* 1995, **48**(2):164-167.
92. Jones C, Nonni AV, Fulford L, Merrett S, Chaggar R, Eusebi V, Lakhani SR: **CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation.** *Br J Cancer* 2001, **85**(3):422-427.
93. Wetzels RH, Kuijpers HJ, Lane EB, Leigh IM, Troyanovsky SM, Holland R, van Haelst UJ, Ramaekers FC: **Basal cell-specific and hyperproliferation-related keratins in human breast cancer.** *Am J Pathol* 1991, **138**(3):751-763.
94. Boecker W, Buerger H: **Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast**

- epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept.** *Cell Prolif* 2003, **36 Suppl 1**:73-84.
95. Behbod F, Rosen JM: **Will cancer stem cells provide new therapeutic targets?** *Carcinogenesis* 2005, **26**(4):703-711.
 96. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW: **Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties.** *Genes Dev* 2002, **16**(6):693-706.
 97. Bocker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, Burger H, Wai D, Ina Diallo R, Brandt B *et al*: **Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept.** *Lab Invest* 2002, **82**(6):737-746.
 98. Potemski P, Kusinska R, Watala C, Pluciennik E, Bednarek AK, Kordek R: **Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer.** *Oncology* 2005, **69**(6):478-485.
 99. Carney WP, Neumann R, Lipton A, Leitzel K, Ali S, Price CP: **Monitoring the circulating levels of the HER2/neu oncoprotein in breast cancer.** *Clin Breast Cancer* 2004, **5**(2):105-116.

